

GENPOLYMORPHISMEN UND BLUTDRUCKVERHALTEN BEI ERWACHSENEN NACH OPERATION EINER ISOLIERTEN AORTENISTHMUSSTENOSE

JUDITH BILDAU



INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin des
Fachbereiches Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Genpolymorphismen und Blutdruckverhalten bei
Erwachsenen nach Operation einer isolierten
Aortenisthmusstenose**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereiches Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Judith Bildau

aus Gießen

Gießen 2010

Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
Abteilung für Kinderkardiologie
Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiter: Prof. Dr. Dietmar Schranz

Deutsches Herzzentrum München (DHM)
Klinik an der Technischen Universität München
Leiter: Prof. Dr. John Hess

Gutachter: Prof. Dr. J. Kreuder
Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. H.-R. Tinneberg

Betreuer: Prof. Dr. J. Kreuder

Tag der Disputation: 21.09.2010

Für Leni Sophia Bildau

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	
1.1	Hypertonie	8
1.2	Aortenisthmusstenose	8
1.3	Hypertonie bei Aortenisthmusstenose	9
1.3.1	Prä-interventionelle Hypertonie	9
1.3.2	Paradoxe Hypertonie	9
1.3.3	Hypertonie im Langzeitverlauf	10
1.4	Genpolymorphismen	10
1.4.1	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	11
1.4.2	Endothelin-System	13
1.4.3	Endotheliale NO-Synthase	14
1.4.4	Adrenerge β -Rezeptoren	14
1.4.5	G-Protein	15
1.4.6	Fibrillin	17
2	FRAGESTELLUNG	
2.1.1	Primäre Fragestellung	18
2.1.2	Weitere Fragestellungen	18
3	MATERIAL UND METHODEN	
3.1	Patientenkollektiv	19
3.2	Klinische Befunderhebung	21
3.3	Material	22
3.3.1	Geräte und Arbeitsmaterialien	22
3.3.2	Oligonukleotide	22
3.3.3	Chemikalien	22

3.3.4	Lösungen	22
3.3.5	Besondere Software	22
3.4	Methoden	22
3.4.1	Gewinnung genomischer DNA	22
3.4.2	Direkter Nachweis primär längendifferenzierter PCR-Produkte	23
3.4.2.1	Genpolymorphismen des Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)	24
3.4.2.1.1	Spezifischer Nachweis der Insertionsvariante des ACE	25
3.4.2.2	Genpolymorphismen des Angiotensinogen (AGT)	25
3.4.2.3	Genpolymorphismen der endothelialen NO-Synthase im Intron 4 (NOS3)	26
3.4.3	Nachweis von Mutation durch Einführung einer Restriktionsstelle	27
3.4.3.1	Reinigung des PCR-Produkt	27
3.4.3.2	Genpolymorphismen des Angiotensin II-Rezeptor Typ1 (ATR1)	28
3.4.3.3	Genpolymorphismen der Aldosteron-Synthetase (CYP11B2)	29
3.4.3.4	Genpolymorphismen des Endothelin (EDN1)	30
3.4.3.5	Genpolymorphismen der endothelialen NO-Synthase im Exon 7 (NOS3)	32
3.4.3.6	Genpolymorphismen der G-Protein/ β 3-Untereinheit (GNB3)	33
3.4.4	Automatisch gestützte Fragmentlängenanalyse	34
3.4.4.1	Genpolymorphismen des Fibrillin-1 (FBN1)	35
3.4.5	Allelic Discrimination	36
3.4.5.1	Genpolymorphismen der adrenergen β_1 -Rezeptoren (ADRB1)	37
3.4.5.2	Genpolymorphismen der adrenergen β_2 -Rezeptoren (ADRB2)	37
3.4.5.2.1	Nachweis des ADRB2, c.46A>G	38
3.4.5.2.2	Nachweis des ADRB2, c.79C>G	38
3.4.5.3	Genpolymorphismen der G-Protein-Rezeptor-Kinase-4 γ (GNB γ)	38
3.5	Statistik	39
4	ERGEBNISSE	
4.1	Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)	41
4.1.1	Ergebnis der primären Fragestellung	41
4.1.2	Ergebnisse der sekundären Fragestellung	41
4.2	Angiotensinogen (AGT)	43
4.2.1	Ergebnis der primären Fragestellung	43

4.2.2	Ergebnisse der sekundären Fragestellung	43
4.3	Endotheliale NO-Synthase im Intron 4 (NOS3)	44
4.3.1	Ergebnis der primären Fragestellung	45
4.3.2	Ergebnisse der sekundären Fragestellung	45
4.4	Angiotensin II-Rezeptor Typ-1 (ATR1)	46
4.4.1	Ergebnis der primären Fragestellung	46
4.4.2	Ergebnisse der sekundären Fragestellung	46
4.5	Aldosteron-Synthetase (CYP11B2)	47
4.5.1	Ergebnis der primären Fragestellung	48
4.5.2	Ergebnisse der sekundären Fragestellung	48
4.6	Endothelin (EDN1)	49
4.6.1	Ergebnis der primären Fragestellung	49
4.6.2	Ergebnisse der sekundären Fragestellung	49
4.7	Endotheliale NO-Synthase im Exon 7 (NOS3)	50
4.7.1	Ergebnis der primären Fragestellung	51
4.7.2	Ergebnisse der sekundären Fragestellung	51
4.8	G-Protein/β3-Untereinheit (GNB3)	52
4.8.1	Ergebnis der primären Fragestellung	52
4.8.2	Ergebnisse der sekundären Fragestellung	52
4.9	Fibrillin-1 (FBN1)	53
4.9.1	Ergebnis der primären Fragestellung	54
4.9.2	Ergebnisse der sekundären Fragestellung	54
4.10	β₁-Rezeptoren (ADRB1)	55
4.10.1	Ergebnis der primären Fragestellung	55
4.10.2	Ergebnisse der sekundären Fragestellung	55
4.11	β₂-Rezeptoren (ADRB2)	57
4.11.1	ADRB2, c.46A>G	57
4.11.1.1	Ergebnis der primären Fragestellung	57
4.11.1.2	Ergebnisse der sekundären Fragestellung	57
4.11.2	ADRB2, c.79C>G	59
4.11.2.1	Ergebnis der primären Fragestellung	59
4.11.2.2	Ergebnisse der sekundären Fragestellung	59
4.12	G-Protein-Rezeptor-Kinase-4γ (GRK4γ)	60
4.12.1	Ergebnis der primären Fragestellung	61

4.12.2	Ergebnisse der sekundären Fragestellung	61
5	DISKUSSION	
5.1	Diskussion der Methodik	63
5.1.1	Gewinnung genomischer DNA	63
5.1.2	Direkter Nachweis primär längendifferenzierender PCR-Produkte	64
5.1.3	Fragmentlängenanalyse und Allelic Discrimination	64
5.2	Diskussion der Ergebnisse	65
5.3	Schlussfolgerung und Ausblick	68
6	ZUSAMMENFASSUNG	69
7	SUMMARY	70
8	LITERATURVERZEICHNIS	71
9	LEBENS LAUF	82
10	DANKSAGUNG	83
11	EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG	85
12	ANHANG	86

1 EINLEITUNG

1.1 Hypertonie

Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen einer primären (sog. essentiellen) und einer sekundären Form der Hypertonie. 90% aller Patienten leiden unter einer primären Hypertonie, bei der keine direkte Ursache gefunden werden kann. Epidemiologische Untersuchungen und die bekannte Familienaggregation sprechen für eine polygenetische Ursache. 10% der Erkrankungen entfallen auf die sekundäre Hypertonie, die ihrerseits renal, renovaskulär, endokrin oder kardiovaskulär bedingt sein kann. Auch eine zentrale Fehlsteuerung (Hirndruck, Hirntumor) kann Bluthochdruck verursachen. Die häufigsten Ursachen für eine renale Hypertonie sind vor allem die akute und chronische Glomerulonephritis, chronische Niereninsuffizienz, Refluxnephropathie, polyzystische Nierendegeneration und Nierenhypoplasie. Zu den endokrinen Ursachen zählen Hyperthyreose, katecholaminproduzierende Tumoren und Erkrankungen der Nebennierenrinde. Die häufigste kardiovaskuläre Ursache ist die Aortenisthmusstenose. Dauerhaft erhöhte Blutdruckwerte führen, unabhängig von der Ursache, zu Schädigung der Endorgane, vor allem zur frühzeitigen Entwicklung einer Arteriosklerose mit koronarer Herzkrankheit, zerebralen Durchblutungsstörungen, arteriosklerotisch bedingten Nierenveränderungen, Augenhintergrundveränderungen und peripherer arterieller Verschlusskrankheit.

1.2 Aortenisthmusstenose

Eine Aortenisthmusstenose entsteht im distalen Aortenbogen zwischen linker A.subclavia und Ductus arteriosus Botalli. Sie entwickelt sich durch in die Aorta versprengtes Ductusgewebe, das sich postpartal zusammenzieht. Etwa 1/3 der auftretenden Aortenisthmusstenosen treten isoliert auf, etwa 1/3 in Kombination mit einem VSD und die restlichen 1/3 in Verbindung mit

komplexen Herzfehlern. Bei hochgradigen Stenosen erfolgt die Durchblutung der unteren Körperhälfte über Ausbildung von Kollateralgefäßen oder über einen persistierenden Ductus Botalli.

1.3 Hypertonie bei Aortenisthmusstenose

Bei dem Krankheitsbild der Aortenisthmusstenose unterscheidet man mindestens drei Formen der arteriellen Hypertonie:

1.3.1 Prä-interventionelle Hypertonie

Vor einer Operation oder Intervention besteht proximal der Stenose, d. h. in der oberen Körperhälfte, eine arterielle Hypertonie bei reduziertem Blutdruck in der unteren Körperhälfte. Die Hypertonie wird dabei nicht allein durch den Fluss, sondern auch durch eine vermehrte Reninausschüttung der Niere verursacht [Schuhmacher et al., 1988; Fallo et al., 1978]. Auch wenn Messungen in Ruhe unter Umständen in der Regel eine normale Reninaktivität zeigen, wird bei leichter Belastung überschießend Renin ausgeschüttet, das über die Renin-Angiotensin-Aldosteron-Kaskade eine Erhöhung des Blutdruckes bewirkt [Parker et al., 1980].

1.3.2 Paradoxe Hypertonie

Wenige Tage nach Beseitigung der Coarctation, häufig nach OP [Choy et al., 1987], deutlich seltener nach Ballonangioplastie [Lewis et al., 1988], kann eine paradoxe arterielle Hypertonie auftreten. Infolge einer verminderten Sensitivität der Barorezeptoren [Sehested et al., 1982] kommt es primär zu einer Noradrenalinausschüttung [Benedict et al., 1978; Fallo et al., 1978] und anschließend zu einer überschießenden Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems [Parker et al., 1980; Rocchini et al., 1987; Tarrka et al., 1987]. Diese Form der post-interventionellen Hypertonie verschwindet im Regelfall nach sechs Wochen. Sie kann jedoch bis zu einem Post-Coarctations-Syndrom mit Symptomen einer Arteriitis der Mesenterialgefäße führen.

1.3.3 Hypertonie im Langzeitverlauf

Eine Hypertonie im Langzeitverlauf nach Aortenisthmusstenose kann viele Ursachen haben. Gelegentlich ist sie durch eine Re- oder Reststenose bedingt. Sie tritt aber auch bei offensichtlich gutem Behandlungsergebnis ohne Hinweis auf Re- oder Reststenose auf. Morphologisch wurden Gefäßwandanomalien gefunden [Isner et al., 1987], die zu einer verminderten Elastizität und Compliance der Aorta führen [Xu et al., 1997; Brili et al., 1998; Ong et al., 1992]. Dies könnte in erster Linie eine systolische Hypertonie erklären. Es gibt Hinweise, dass diese Gefäßanomalien angeboren [Isner et al., 1987] oder durch die Hypertonie vor der Operation sekundär entstanden sind [Brili et al., 1998]. Bezüglich humoraler Mechanismen scheint ebenfalls die Überaktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, insbesondere unter Belastung, eine Rolle zu spielen [Hauser et al., 2000; Ross et al., 1992; Simsolo et al., 1988], wobei eine klare Abgrenzung zur Hypertonie bei Restenose schwierig ist.

1.4 Genpolymorphismen

Genetische Faktoren bestimmen 30- 50% der Blutdruckvariationen in der Normalbevölkerung [Munroe et al., 2000]. Polymorphe Allele der verschiedensten an der Blutdruckregulation beteiligten Gene werden als wahrscheinliche Ursache der genetisch bedingten Variabilität des Blutdrucks angesehen und zunehmend in ihrer funktionellen Bedeutung für die essentielle Hypertonie und sekundäre Hypertonieformen charakterisiert. Folgende Genpolymorphismen, die im Weiteren genauer erklärt werden, wurden in unterschiedlichem Maße mit einer arteriellen Hypertonie assoziiert oder bei sekundären, hypertoniebedingten Organmanifestationen gefunden [Rosskopf et al., 2006]:

- Renin-Angiotensin-Aldosteron-System: Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), Angiotensinogen (AGT), Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 (ATR1) und Aldosteron-Synthase (CYP11B2)
- Endothelin (EDN-1)

-
- endotheliale NO-Synthase (NOS3)
 - β_1 -Adrenorezeptoren (ADRB1)
 - β_2 -Adrenorezeptoren (ADRB2)
 - G-Protein/ β_3 -Untereinheit (GNB3)
 - G-Protein/Rezeptor-Kinase-4 γ (GRK4 γ)
 - Fibrillin-1-Gen (FBN1)

1.4.1 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Die saure Protease Renin befindet sich in den renalen Epitheloidzellen der afferenten und der efferenten Arteriolen. Dort wird sie in lysosomalen Granula gespeichert. Barorezeptoren bewirken, dass bei vermindertem renalen Perfusionsdruck die Reninsekretion ansteigt. Die Empfindlichkeit der Barorezeptoren ist bei Natriummangel deutlich gesteigert. Nach der Freisetzung spaltet Renin von Angiotensinogen, das in der Leber synthetisiert und ins Plasma abgegeben wird, das Dekapeptid Angiotensin I ab.

Angiotensin I wird durch das im Blut und in der Lunge vorkommende Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) in Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II besitzt einerseits eine starke vasokonstriktorische Wirkung, andererseits stimuliert es die Aldosteron-Freisetzung aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. Aldosteron steigert in den distalen Nierentubuli die Natrium- und Wasserrückresorption.

Die Ursachenforschung des Bluthochdrucks brachte es mit sich, dass Anfang der 90er Jahre verschiedene Genpolymorphismen der an dem RAAS beteiligten Enzyme und Rezeptoren entdeckt wurden. Als im Jahre 1990 Rigat und Mitarbeiter erstmals einen Genpolymorphismus des ACE-Gens beschrieben, bot dies die Grundlage für weitere Untersuchungen [Rigat et al., 1990]. Das Vorhandensein (Insertion) oder Fehlen (Deletion) einer Sequenz im Intron 16 des ACE-Gens bestimmt zu 50% die individuell sehr unterschiedlichen ACE-Spiegel, wobei homozygote Träger des D-Allels die höchsten Spiegel besitzen und homozygote Träger des I-Allels die niedrigsten [Rigat et al., 1990]. Weiterhin wurde untersucht, ob die Genpolymorphismen des ACE-Gens mit dem Auftreten einer Hypertonie bzw. deren Folgeerkrankungen assoziiert sind. Lindpaintner und Mitarbeiter konnten

beispielsweise 1995 zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der durch die Deletion entstandenen höheren ACE-Aktivität und ischämischen Herzerkrankungen bis hin zum Myokardinfarkt besteht. Andere Arbeitsgruppen [Pontremoli et al., 2000] fanden heraus, dass die Deletion sowohl für eine erhöhte ACE-Aktivität, als auch für eine linksventrikuläre Hypertrophie ursächlich sein kann.

Die Entdeckung weiterer Genvariationen der Peptide des RAAS, wie die des Angiotensinogens (AGT) und des Angiotensin II-Rezeptors (ATR1), boten zusätzliche Ansatzmöglichkeiten für Forscherteams, Ursachen renovaskulärer Erkrankungen genetisch zu begründen. Die Genpolymorphismen des AGT, dem ersten Glied der Kaskade des RAAS, wurden 1992 von Jeunemaitre und Mitarbeitern erstmals beschrieben. Insbesondere die Punktmutation auf dem Chromosom 1q42-43, bei der ein Basenaustausch im Exon 2 des AGT-Gens (c.704C>T) besteht, wurde mit der Pathogenese der essentiellen Hypertonie in Verbindung gebracht [Jeunemaitre X et al., 1992; Hata et al., 1994; Say et al., 2005] sowie als Risikofaktor für Hirninfarkte mit Todesfolge [Brenner et al., 2005] benannt.

Bonnardeaux und Mitarbeiter identifizierten 1994 insgesamt 5 verschiedene Polymorphismen des ATR1-Gens, wobei die Genvariante c.1166A>C, ein Austausch von Adenosin zu Cytosin an Position 1166, für die Entwicklung eines arteriellen Bluthochdrucks prädisponiert [Bonnardeaux et al., 1994]. Auch andere Forschungsgruppen [Duncan et al., 2001] konnten zeigen, dass durch diesen Basenaustausch eine erhöhte AGTR1-Aktivität entsteht und somit irreguläres Blutdruckverhalten auftritt. Zudem wird bereits davon ausgegangen [Benetos et al., 1996], dass dieser Basenaustausch ein Risikofaktor für arterielle Umbauvorgänge bei Patienten mit Bluthochdruck ist.

Die Aldosteron-Freisetzung stellt das Endglied der RAAS-Kaskade dar. Davis und Mitarbeiter zeigten im Jahr 1999, dass durch den Basenaustausch (CYP11B2, c.-344C>T) in der Promoterregion des Aldosteron-Synthetase-Gens die Aldosteronsekretion steigt und dadurch eine pathologische Blutdruckreaktion hervorgerufen wird [Davies et al., 1999].

Endotheline sind Gewebshormone, die als funktionelle Antagonisten von EDRF (endothelial derived relaxing factor) wirken. Man kennt bisher drei Isoformen: EDN-1, EDN-2 und EDN-3, deren Gene auf den Chromosomen 6, 1 und 20 lokalisiert sind. In aktiver Form sind alle Endotheline Polypeptide mit einer Länge von 21 Aminosäuren. Sie entstehen aus längeren Vorläufermolekülen durch mehrfache proteolytische Spaltung. Ihre spezifischen Rezeptoren (Endothelin-Rezeptor-A und -B) gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Zelloberflächenrezeptoren. Endotheline sind als Vasokonstriktoren an der Durchblutungsregulation beteiligt. Die wichtigsten Bildungsorte sind Endothelzellen, Epithelzellen, neuronale und intestinale Zellen. Stimulierende Faktoren der Bildung sind Hypoxie, IL-2, TGF- β , Vasopressin, Angiotensin II, Thrombin, Bradykinin, PAF, ATP u. a., die über eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in den Bildungszellen die Endothelinproduktion vermehren.

Yanagisawa et al. isolierten 1988 erstmals Endothelin-1 aus dem Kulturüberstand von Endothelzellen der Schweineaorta [Yanagisawa et al., 1988]. Diese Substanz zeigte einen sehr starken gefäßverengenden Effekt, der sogar denjenigen von dem bis dahin als stärkstes vasokonstriktorisches Molekül bekannten Angiotensin II übertraf. Bis heute zählt Endothelin zu den stärksten Vasokonstriktoren und wurde bereits in verschiedenen Arbeiten mit einer Hypertonie in Verbindung gebracht. So konnten Tired und Mitarbeiter 1999 bereits zeigen, dass ein Aminosäureaustausch (p.Lys198Asn) im Exon 4 des EDN-1-Gens in Kombination mit einem erhöhten BMI ($\geq 26 \text{ kg/m}^2$) stark mit erhöhten systolischen sowie diastolischen Blutdruckwerten assoziiert ist [Tired et al., 1999]. Andere Arbeitsgruppen [Iglarz et al., 2001] berichteten, dass es durch diesen Aminosäureaustausch zu einer erhöhten Sensitivität für α -adrenerge Agonisten wie Phenylephrin und somit zu einem erhöhten vaskulären Tonus kommt.

1.4.3

Endotheliale NO-Synthase

Der labile Faktor, der die glatte Gefäßmuskulatur relaxiert, ist als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert worden. Eine Reihe endogener, rezeptorabhängiger Substanzen, wie Acetylcholin, ATP, Bradykinin, Histamin, Serotonin, Oxytocin, Thrombin u.a., wirken über die Freisetzung von NO vasodilatierend. Es kommt jedoch bereits in Ruhe zu einer kontinuierlichen, basalen NO-Freisetzung aus dem Endothel und damit zur Abschwächung der sympathisch-adrenerg vermittelten Konstriktion.

Die Bildung von NO erfolgt mit Hilfe eines im Endothel dauerhaft exprimierten Enzyms, einer endothelialen NO-Synthase (eNOS). Dieses Enzym bildet NO aus einem Stickstoffatom der Guanidiniumgruppe der Aminosäure L-Arginin. Die Aktivität dieses Enzyms wird dabei in erster Linie über die Konzentration des freien intrazellulären Ca^{2+} geregelt.

Es ist bereits bekannt [Colombo et al., 2002; Paradossi et al., 2004], dass ein Basenaustausch (c.894G>T, p.Glu298Asp) im Exon 7 des NO-Synthase-Gens mit dem Vorhandensein, der Ausbreitung und dem Schweregrad von arteriellen Umbauvorgängen, die bis zur Artherosklerose führen können, assoziiert ist.

Es wurde ebenfalls beschrieben [Tsukada et al., 1998; Uwabo et al., 1998], dass eine 27 bp lange Deletion im Intron 4 die Aktivität der NO-Synthase herunter regulieren und es so zu einer pathologischen Blutdruckreaktion kommen kann.

1.4.4

Adrenerge β -Rezeptoren

Die Membranrezeptoren für Adrenalin und Noradrenalin werden Adrenorezeptoren genannt. Sie werden in α - und β -Rezeptoren unterteilt. Ihre molekularen Strukturen sind im Wesentlichen aufgeklärt. Es handelt sich um transmembranäre Proteine mit 7 Helixstrukturen in den Membranen der Effektorzellen sowie Schleifen und je einer Endkette auf der extra- und intrazellulären Seite. Man unterscheidet 2 Familien von α -Adrenorezeptoren (α_1 und α_2), die je noch einmal in 3 Untertypen eingeteilt werden, und 3 Typen von β -Adrenorezeptoren. β -Rezeptoren vermitteln ihre Wirkung über G-Proteine durch Aktivierung der Adenylatzyklase. Über β_1 -Rezeptoren wird die

intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht, was am Herzen positiv-chrono-, dromo- und inotrop wirkt und in der Niere die Reninfreisetzung erhöht. β_2 -Rezeptoren wirken über eine Reduktion der Ca^{2+} -Konzentration. Sie vermitteln die Dilatation von Blutgefäßen und Bronchiolen, die Entspannung der Magen- und Darmmuskulatur, die Stimulation der Insulinfreisetzung sowie die Steigerung der Lipolyse und der Glykogenolyse.

Ranade et al. konnten bereits zeigen, dass es durch einen Nukleotid- und somit Aminosäureaustausch (ADRB1, p.Ser49Gly, c.145A>G) im Exon 2 des β_1 -Rezeptor-Gens zu einer verstärkten Rezeptoraktivität und damit zu einer Erhöhung des Ruhepulses, unabhängig von BMI, Alter, Geschlecht oder Behandlung mit β -Blockern, kommt. Die Studie zeigte, dass Personen, die homozygot für das Ser-Allel sind, die höchste Ruhfrequenz, Personen, die heterozygot sind, eine mittlere Ruhfrequenz und Personen, die homozygot für das Gly-Allel sind, die niedrigste Ruhfrequenz haben [Ranade et al, 2002].

Es wurde außerdem dargestellt [Green et al., 1994; Green et al., 1995; Timmermann et al., 1998; Rosmond et al., 2000], dass es durch einen Nukleotidaustausch (ADRB2, c.46A>G) im Exon 1 des β_2 -Rezeptor-Gens zur Down-Regulation der β_2 -Rezeptoren und damit zu pathologischen Blutdruckwerten kommen kann.

Im Gegensatz dazu wurde ebenfalls bereits gezeigt [Green et al., 1994; Green et al., 1995; Cockcroft et al, 2000], dass ein Aminosäureaustausch an einer anderen Stelle des Exon 1 (ADRB2, c.79C>G), dass heißt dem Vorhandensein von Glu27 statt Gln27 (Gln27→Glu), einer Down-Regulation der β_2 -Rezeptoren entgegenwirkt und die Patienten in höherem Maße auf Vasodilatoren wie Isoproterenol reagieren. So stellten Yilmaz und Mitarbeiter 2009 dar, dass Patienten mit dem Glu27-Allel ein geringeres Herzinfarkttrisiko hatten [Yilmaz et al., 2009].

1.4.5 G-Protein

Steuernde Informationen von außerhalb werden über Rezeptoren, G-Proteine und eine intrazelluläre Signalkaskade weitergeleitet. Am Anfang der komplizierten Reaktionskette liegt ein Rezeptor R_s an der Außenseite der Plasmamembran, der für verschiedene Überträgerstoffe und Hormone eine

spezifische Bindungsstelle ist (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, z.B. für β_1 - und β_2 -adrenerge Substanzen, Endothelin, Angiotensin). R_S ändert nach Bindung eines spezifischen Moleküls seine Konformation und gibt dies an ein an der Innenseite der Membran liegendes Protein G_S weiter. Dieses heterotrimere Protein G_S besteht aus drei Untereinheiten (α , β und γ). An α ist in Ruhe GDP gebunden, welches nach Aktivierung durch zytosolisches GTP ersetzt wird. Gleichzeitig werden die Untereinheiten β und γ abgespalten. Dazu ist Mg^{2+} notwendig. Es kommt nun zur Aktivierung einer Signalkaskade, an der verschiedene Enzyme (wie z.B. die Adenylatzyklase) und „second messenger“ (wie z.B. cAMP) beteiligt sind. Es kann jedoch auch über einen hemmenden extrazellulären Überträgerstoff ein hemmender Rezeptor R_i stimuliert werden.

Eine Schlüsselrolle in der Regulierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren spielt die Phosphorylierung intrazellulärer Domänen des Rezeptors durch Proteinkinasen. So inaktivieren cAMP-abhängige Proteinkinasen (wie z.B. die Proteinkinase A) in Gegenwart von cAMP den Rezeptor. Zudem phosphorylieren G-Protein-Rezeptor-Kinasen selektiv aktivierte Rezeptoren.

Es wird davon ausgegangen [Schunkert et al., 1998; Siffert et al., 1998], dass durch einen Basenaustausch (c.825C>T) im Exon 10 des Gens, welches für die β_3 -Untereinheit des G-Proteins codiert, G-Proteine überschießend stimuliert werden können und ein hypertensives Blutdruckverhalten entstehen kann.

Des Weiteren wurde gezeigt [Felder et al., 2002], dass es durch einen Basenaustausch (c.679C>T) im Exon 5 des Gens, das für die G-Protein-Rezeptor-Kinase-4 γ codiert, zu einer Hochregulation der Kinase-Aktivität kommt und somit ebenfalls hypertensive Blutdruckreaktionen entstehen können. Diese Kinase inhibiert aktivierte Rezeptor-gekoppelte G-Proteine und ermöglicht somit eine noch feinere Abstimmung der Effekte von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [Roskopf et al.; 2006].

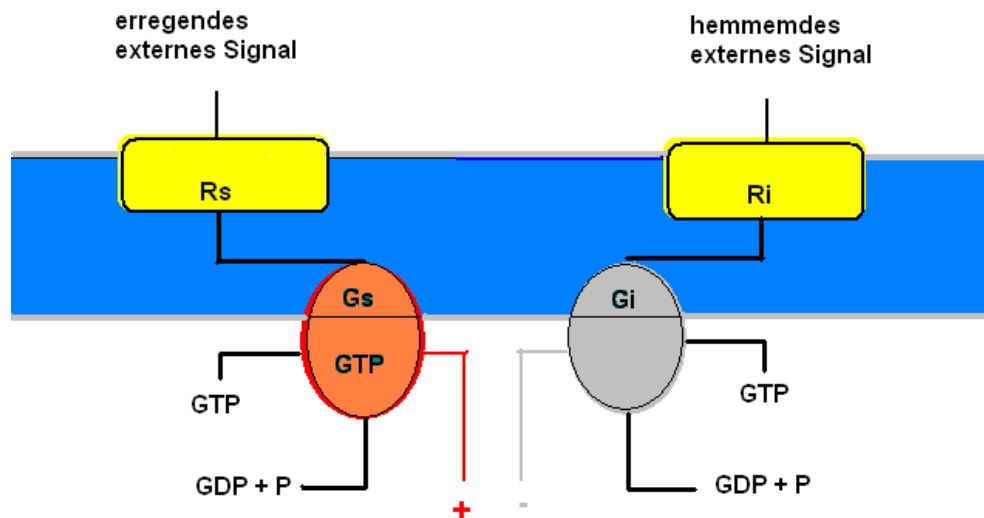


Abbildung 1: Signalübertragung durch G-Proteine

1.4.6. Fibrillin-1

Elastische Fasern bestehen aus quervernetzten Tropoelastinmolekülen und Mikrofibrillen. Sie sind gut dehnbar und können um mehr als das Doppelte ihrer Ausgangslänge gedehnt werden. Sie haben in der Regel einen Durchmesser von 2 μm und verzweigen sich. Elastische Fasern kommen in Bändern, Arterien und Knorpel vor sowie in Geweben und Organen, die aus funktionellen Gründen gut dehnbar sein müssen.

Die Mikrofibrillen bestehen im Wesentlichen aus dem Protein Fibrillin, von dem es mehrere Typen gibt, und einigen anderen Begleitkomponenten. Fibrillin wird von Fibroblasten, glatten Muskelzellen und einigen anderen Zelltypen synthetisiert.

Man geht davon aus [Powell et al., 1997; Powell et al., 2005; Medley et al., 2002], dass eine Wiederholungssequenz (TAAAA) im Intron 28 des Fibrillin-1-Gens einen Einfluss auf die Gefäßelastizität und damit auch auf die Ausprägung eines Bluthochdruckes hat.

2 FRAGESTELLUNG

2.1.1 Primäre Fragestellung

Liegen bei Patienten mit Aortenisthmusstenose, die im Langzeitverlauf eine Hypertonie entwickeln, gehäuft bestimmte Gen-Allele vor?

2.1.2 Weitere Fragestellungen

Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Ausprägung der Hypertonie und den untersuchten Genpolymorphismen?

Haben die untersuchten Genpolymorphismen einen Einfluss auf das circadiane Blutdruckverhalten?

Sind Patienten mit einem bestimmten Genpolymorphismus häufiger medikamentös vorbehandelt?

Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Blutdruckverhalten bei Belastung und den untersuchten Genpolymorphismen?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Patientenkollektiv

Alle Patienten, die sich im Rahmen der COALA-Studie (Coarctation Longterm Assessment) einer Nachuntersuchung unterzogen, wurden klinisch vom Deutschen Herzzentrum München erfasst. Es handelt sich dabei um 273 Erwachsene, die zum Untersuchungszeitpunkt älter als 16 Jahre alt waren und an einer isolierten Aortenisthmusstenose im Deutschen Herzzentrum München operiert wurden. Voraussetzung war, dass keine Restenose (dopplersonographischer Restgradient > 20 mmHg) festgestellt wurde.

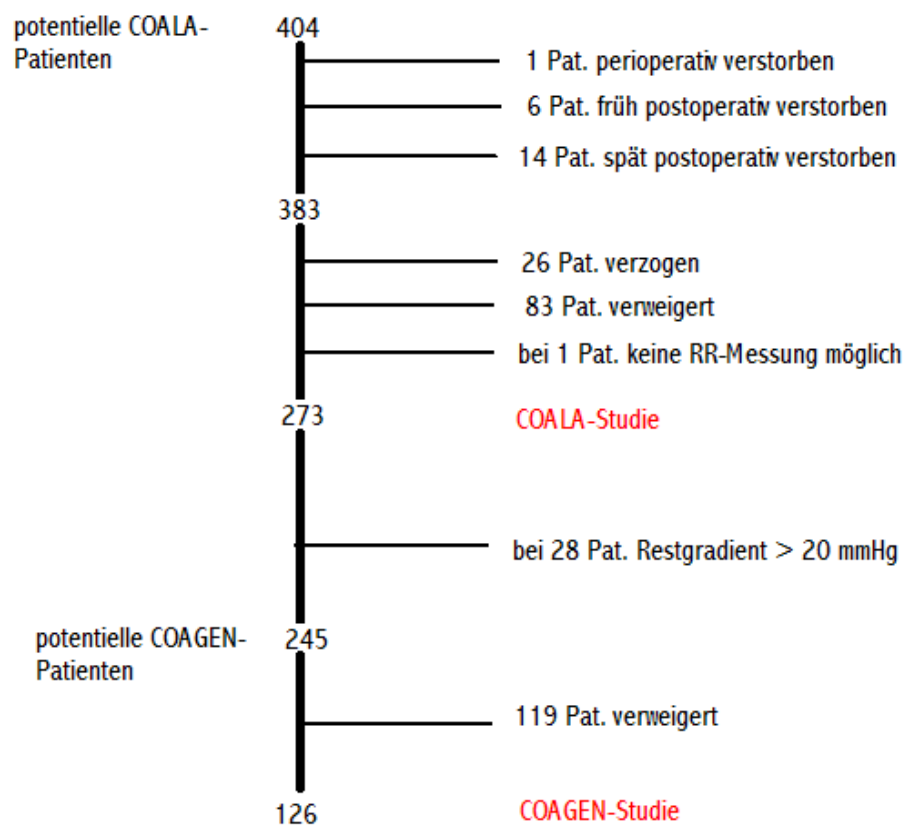


Abbildung 2: Patientenkollektive der COALA- und COAGEN-Studie

Für die Auswertung wurden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt: *normoton* versus *hyperton*. In die Gruppe der normotonen Patienten wurden alle Patienten eingeteilt, bei denen jedes der folgenden Kriterien erfüllt wurde:

- keine blutdrucksenkende Medikation
- 24-h-Blutdruckmittelwert sowohl systolisch, als auch diastolisch unter 134/79 mmHg [Ohkubo et al., 1998]
- systolischer Blutdruck unter keiner Belastungsstufe über der 97. Perzentile für die jeweilige Belastungsstufe nach Heck [Heck et al., 1984]

Alle anderen Patienten wurden in die Gruppe *hyperton* eingeteilt.

Von den 126 klinisch und molekularbiologisch untersuchten Patienten zeigten sich 40% normotensiv, 27% hypertensiv mit medikamentöser Behandlung und 23% hypertensiv ohne medikamentöse Behandlung. 10% der Patienten fielen durch einen Belastungshypertonus auf.

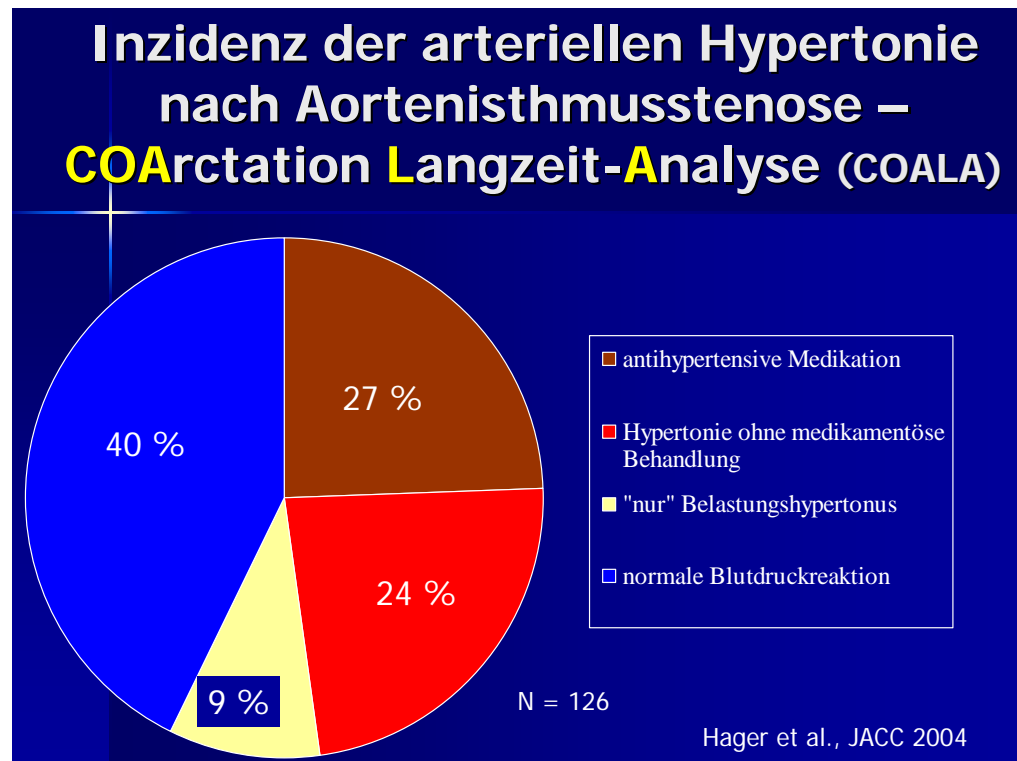


Abbildung 3: Inzidenz der arteriellen Hypertonie nach Aortenisthmusstenose (Hager et al., 2004)

Die klinische Untersuchung wurde im Deutschen Herzzentrum München im Rahmen der COALA-Studie durchgeführt. Folgende Befunde wurden erhoben:

- Anamnese mit blutdruckwirksamer Medikation

- klinische Untersuchung:

→ Doppler-Blutdruckmessung an 4 Extremitäten

→ Fahrradergometrie in sitzender Position bis zur Symptomlimitierung nach WHO-Protokoll (Start mit 25 Watt, Steigerung um 25 Watt alle 2 Minuten) mit Messung des Blutdruckverlaufes am Ende jeder Belastungsstufe nach Riva-Rocci. Für die Auswertung wurde der systolische Blutdruck (RR in mmHg) unter maximaler Belastung (P in Watt) verwendet und dessen altersabhängiger (A in Jahren) Standard Deviation Score ($SDS = [\text{Gemessener Wert} - \text{Normwert}] / \text{Standardabweichung}$) nach folgender Formel berechnet [Heck et al., 1984]:

$$SDS = [RR - (111,2 + 0,334 \cdot P + 0,310 \cdot A)] / 17,9$$

→ Langzeitblutdruckmessung über einen Zeitraum von 24 Stunden mittels oszillometrischer Messtechnik. Messung an dem Oberarm, bei dem in Ruhe ein höherer Blutdruckwert gemessen wurde. Messintervall zwischen 6 und 24 Uhr jeweils 20 Minuten, zwischen 24 und 6 Uhr jeweils 60 Minuten. Beurteilt wurden alle Profile mit mehr als 70% erfolgreichen Messungen. Beurteilt wurde jeweils das Gesamtprofil, das Tagesprofil (6-24 Uhr) und das Nachtprofil (24-6 Uhr) sowie die Tag-Nacht-Rhythmik. Die zirkadiane Variabilität wurde als das Verhältnis der mittleren Tag- und Nachtwerte ($\text{Dipping} = [\text{mittlerer Tagwert} - \text{mittlerer Nachtwert}] / \text{mittlerer Tagwert}$) definiert. Als Grenzwert des nächtlichen Blutdruckabfalls wurden ein systolischer Blutdruckabfall von mindestens 10% und ein diastolischer Blutdruckabfall von mindestens 20% des Tageswertes gefordert [Verdecchia et al., 1994; Holl et al., 1999; Sorof et al., 2000].

3.3 Material

3.3.1 Verwendete Geräte und Arbeitsmaterialien siehe Anhang

3.3.2 Sequenzen der Oligonukleotide siehe Anhang

3.3.3 Verwendete Chemikalien siehe Anhang

3.3.4 Verwendete Lösungen siehe Anhang

3.3.5 Besondere Software siehe Anhang

3.4 Methoden

3.4.1 Gewinnung genomischer DNA

Die genomische DNA wurde mittels *QIAmp® Spin Mini Kit* aus dem Vollblut gewonnen. Zunächst wurden 200 µl des Patientenblutes in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß zusammen mit Proteinase K pipettiert (Proteaseverdau). Danach wurden 200 µl des AL-Puffers (Lyse-Puffer) hinzu gegeben. Die Lösung wurde mit dem Tischrührer gemischt und schließlich für 10 Minuten bei 56°C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl 100%iges Ethanol in die Lösung pipettiert und erneut gemischt. Die gesamte Lösung wurde in eine sterile 2-ml-Säule pipettiert und 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert, danach in ein offenes 1,5-ml-Gefäß gesetzt und 500 µl des AW1-Puffers (Waschpuffer) zur Lösung hinzu gegeben. Die Lösung wurde erneut für 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde schließlich wieder in ein offenes 1,5-ml-Gefäß gesetzt; 500 µl des AW2- Puffers (Waschpuffer) wurden zur Lösung pipettiert. Es folgte die Zentrifugation für 3 Minuten bei 14000 rpm. Nach dem Einsetzen der Säule in ein offenes 1,5 ml-Gefäß, wurde sie für 1 Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde in ein steriles 1,5 ml-Gefäß der Firma Eppendorf gesetzt, es wurden 125 µl Wasser hinzugefügt und die Lösung für 5 Minuten bei Raumluft inkubiert. Es folgte die Zentrifugation für

1 Minute bei 8000 rpm. Danach konnte die genomische DNA entnommen werden. Die Konzentration der DNA wurde spektralphotometrisch gemessen.

3.4.2 Direkter Nachweis primär längendifferenzierender PCR-Produkte

Die Polymerasen-Ketten-Reaktion ist eine Methode, um spezifische DNA-Abschnitte amplifizieren zu können. Benötigt werden dazu synthetisierte Oligonukleotide, so genannte Primer, die komplementär zu dem DNA-Abschnitt sind, welcher vervielfältigt werden soll. Zunächst werden die DNA-Moleküle durch eine Temperaturerhöhung in ihre Einzelstränge zerlegt. Dann wird die Reaktion auf eine Temperatur abgekühlt, bei der die Primer spezifisch an einen DNA-Abschnitt binden. Diese Temperatur wird als *Annealing-Temperatur* bezeichnet. Nachdem die Primer an ihre Zielsequenz gebunden haben, werden sie von einer DNA-Polymerase verlängert. Auch die Polymerisation ist temperaturabhängig. Man nennt diesen Schritt *Elongation*. Nach dieser Phase wird erneut auf die Schmelztemperatur erhitzt, um die neu synthetisierten Stränge zu trennen. Ein neuer Zyklus beginnt. Durch mehrfache Wiederholung kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Abschnitten.

Eine so genannte *nested-PCR* dient der weiteren Erhöhung von Sensitivität und Spezifität der Reaktion. Sie besteht aus zwei hintereinander geschalteten PCR-Läufen. Im ersten Lauf wird ein größeres Fragment der DNA mittels eines externen Primerpaares amplifiziert. Im zweiten Lauf liegen die internen Primer innerhalb der im ersten Lauf amplifizierten Sequenz.

Um die Amplifikation nachweisen zu können, nutzt man die Gelelektrophorese. Das Gel besteht aus einer Mischung aus Agarose und 10xTAE-Puffer. Für den Nachweis werden 15 µl des PCR-Produkts, welches vorher zusätzlich mit 3 µl Blaumarker angefärbt wurde, auf das Gel aufgetragen. Parallel zu den PCR-Produkten werden 4 µl eines DNA-Längenstandards, verdünnt mit 11 µl destilliertem Wasser und 3 µl Blaumarker, aufgetragen. Das Gel wird an eine elektrische Spannung angeschlossen, dann mit Ethidiumbromid, einem Fluoreszenzfarbstoff, der in

die DNA interkaliert, angefärbt, danach in einem Wasserbad gereinigt und schließlich unter UV-Licht ausgewertet.

3.4.2.1 Genpolymorphismen des Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)

Zunächst wurde ein Mastermix angesetzt und auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt. Dieser bestand aus 10xPCR-Puffer, dNTPs, Primerpaaren, Taq-Polymerase und destilliertem Wasser. Die Erstellung des Mastermixes erfolgte zur Vermeidung von Kontaminationen in einem separaten Raum (Prä-PCR). Danach wurde in den Laborräumen die genomische DNA der Patienten in die jeweiligen Cups hinzu gegeben.

Nach Beendigung des PCR-Vorganges erfolgte die Auswertung mittels Gelelektrophorese. Das Gel bestand aus 1,5 g Universal-Agarose und 100 ml 10x TAE-Puffer. Das Gel wurde an eine Spannungsquelle geschlossen und für 3 Stunden bei 120 V laufen gelassen. Die Fragmentlänge des Allels I lag bei 597 bp, die Fragmentlänge des Allels D bei 319 bp. Der Längenmarker trennte sich in 50 bp langen Schritten auf.

→ Reagentienmix und Temperaturprotokoll siehe Anhang

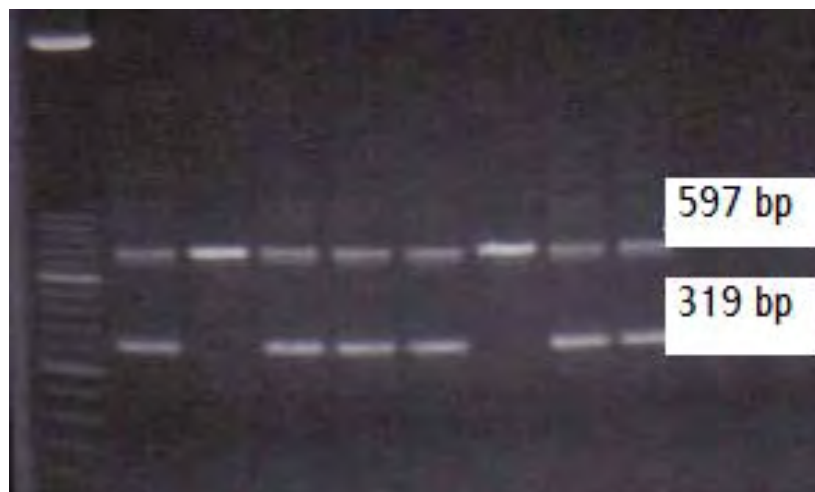


Abbildung 4: Gelelektrophorese des ACE

3.4.2.1.1 Spezifischer Nachweis der Insertionsvariante des ACE

Selbst unter optimalen Bedingungen kann es bei dem Nachweis der Genpolymorphismen des ACE zu Fehlergebnissen von DD anstelle von ID kommen. Nur durch die Durchführung einer zusätzlichen PCR mit „I“-spezifischen Primern [Fogarty et al., 1994; Shanmugam et al., 1993] kann eine Fehlbestimmung vermieden werden. Diese PCR wurde bei allen Patienten mit dem DD-Genotyp durchgeführt. Nur bei Anwesenheit eines Insertionsallels ergab sich eine Bande mit der Fragmentlänge von 335 bp. Alle Proben, die bisher fälschlicherweise als DD angesehen wurden, mussten danach in ID umgeändert werden.

→ Reagentienmix und Temperaturprotokoll siehe Anhang

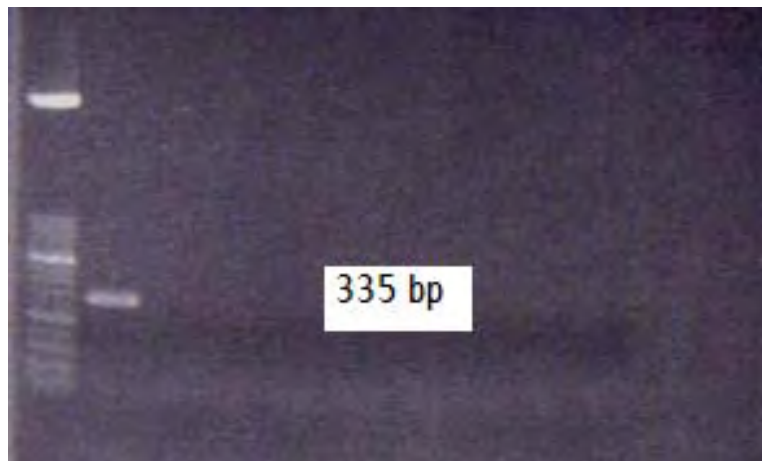


Abbildung 5: Gelelektrophorese der Insertionsvariante des ACE

3.4.2.1.2 Genpolymorphismen des Angiotensinogen (AGT)

Der Unterschied zu dem üblichen Vorgehen zum Nachweis von primär längendifferenten Produkten liegt darin, dass anstatt zwei Primern drei benötigt werden. Der AGT-int-up-Primer entspricht einem forward-Primer. Der AGT-2-Primer ist ein reverse-Primer, der für die Amplifikation des Wildtyps sorgt. Dieser Wildtyp enthält die Aminosäure Threonin. Der längere AGT-3-Primer ist ebenfalls ein reverse-Primer und weist die Punktmutation (c.704T>C), also den Austausch der Aminosäure Threonin durch Methionin, nach. Das PCR-Produkt wurde auf ein 4,5%iges 3:1-Agarose-Gel aufgetragen. Dieses bestand

aus 4,5 g 3:1-Agarose und 100 ml 10xTAE-Puffer. Die 3:1-Agarose wurde auf Grund des geringen Fragmentlängeunterschieds gewählt. Sie ist eine Mischung aus der dreifachen Menge von Wide Range-Agarose, einer hochauflösenden Agarose, und der einfachen Menge von Universal-Agarose. Das Gel wurde für 4,5 Stunden bei 120 V laufen gelassen. Das T-Allel hatte eine Fragmentlänge von 140 bp, das M-Allel von 151 bp.

→ Reagentienmix und Temperaturprotokoll siehe Anhang

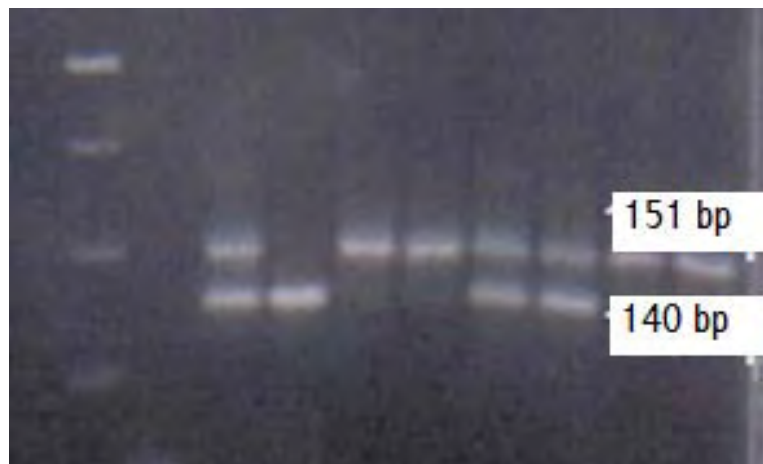


Abbildung 6: Gelelektrophorese des AGT

3.4.2.1.3 Genpolymorphismen der endothelialen NO-Synthase im Intron 4 (NOS3)

Es wurde nach üblichem Vorgehen der PCR-Ansatz angefertigt. Nach Beendigung des PCR-Laufes wurde das Produkt auf ein 4,5%iges Agarose-Gel aufgetragen. Die hohe Konzentration wurde wegen des geringen Fragmentlängenunterschiedes der beiden Allele gewählt. Das Gel wurde für 4 Stunden an eine Spannungsquelle mit 120 V angeschlossen. Das Allel b hatte eine Fragmentlänge von 448 bp, das Allel a von 421 bp.

→ Reagentienmix und Temperaturprotokoll siehe Anhang

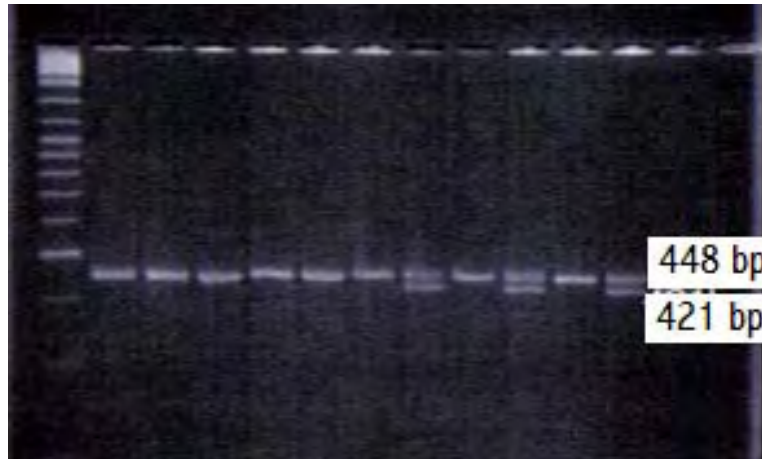


Abbildung 7: Gelelektrophorese des NOS3-In4

3.4.3 Nachweis von Mutationen durch Einführung einer Restriktionsschnittstelle

Durch einen gezielten Einbau einer fehlgepaarten Base in der Nähe des 3'-Endes des Primers kommt es, sofern ein Nukleotidaustausch vorhanden ist, zu einer Restriktionsschnittstelle. Das entsprechende Nukleotid des anderen Allels ist dazu nicht in der Lage. Durch eine anschließende Restriktionsspaltung lässt sich das Amplikon vollständig, partiell oder gar nicht spalten. Dadurch ist eine Unterscheidung von Homozygotie und Heterozygotie möglich. Eine ausgebliebene Restriktionsspaltung weist darauf hin, dass nur ein Allel vorhanden ist, eine stattgefundenene Spaltung dagegen deutet darauf hin, dass beide Allele vorhanden sind. Auch hier erfolgt die Auswertung mittels Gelelektrophorese.

3.4.3.1 Reinigung des PCR- Produktes

Bevor das PCR-Produkt mit Restriktionsenzymen geschnitten wurde, wurde zunächst eine Reinigung mit dem *QIAquick® Purification Kit* vorgenommen. Zunächst wurde das PCR-Produkt in einem 2 ml-Reaktionsgefäß mit dem fünffachen Volumen von PB-Puffer (Bindungspuffer) gemischt und die gesamte Lösung schließlich in eine 2 ml-Säule pipettiert. Die Säule wurde für 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert und die abzentrifugierte Lösung verworfen. In die Säule wurden 740 µl des PE-Puffers (Waschpuffer) hinzu gegeben. Nochmals wurde für 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert, das Zentrifugat

dann ebenfalls verworfen. Anschließend erneute Zentrifugation bei 13000 rpm für 1 Minute. Die Säule wurde schließlich in ein offenes 1,5 ml-Gefäß gesetzt und die genomische DNA in Wasser eluiert. Nach einer letzten Zentrifugation bei 13000 rpm für 1 Minute konnte das gereinigte PCR-Produkt entnommen und mit spezifischen Enzymen verdaut werden.

3.4.3.2 Genpolymorphismen des Angiotensin II-Rezeptor Typ-1 (ATR1)

Da es sich bei dieser PCR um eine nested-PCR handelte, mussten zwei PCR-Läufe angesetzt werden. Vor jedem PCR-Lauf wurde der Mastermix, bestehend aus 10xPCR-Puffer, dNTPs, Primern, Taq-Polymerase und destilliertem Wasser, im Prä-PCR-Raum angesetzt. Die genomische DNA bzw. das 1.PCR-Produkt wurde schließlich im Labor in die einzelnen Cups hinzugegeben. Nach Ablauf des 2.PCR-Laufes wurde das Produkt auf ein 1,5%iges Agarosegel gegeben, um den Erfolg der PCR zu kontrollieren. Das Gel wurde für 3 Stunden an eine Spannungsquelle mit 120 V angeschlossen.

→ Reagentienmix und Temperaturprotokoll siehe Anhang



Abbildung 8: Gelelektrophorese des ATR1 (nach 2.PCR-Lauf)

Danach wurde das Produkt mit dem *QIAquick® Purification Kit*, einem Säulensystem, gereinigt und mit 30 µl Wasser eluiert. Schließlich wurde der Enzymverdauansatz angefertigt. Dieser wurde für 6 Stunden bei 37°C verdaut. Danach wurde das Produkt auf ein 3%iges Agarose-Gel aufgetragen. Die höhere Konzentration wurde gewählt, um eine bessere Bandenauftrennung zu

ermöglichen. Das Gel wurde für 4,5 Stunden bei 120 V laufen gelassen; die Auswertung erfolgte nach Anfärbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht. Die Banden des Allel A lagen bei 506 bp, 143 bp und 55 bp, die Banden des Allel C bei 506 bp und 198 bp.

→ Reagentienmix und Temperaturprotokoll siehe Anhang

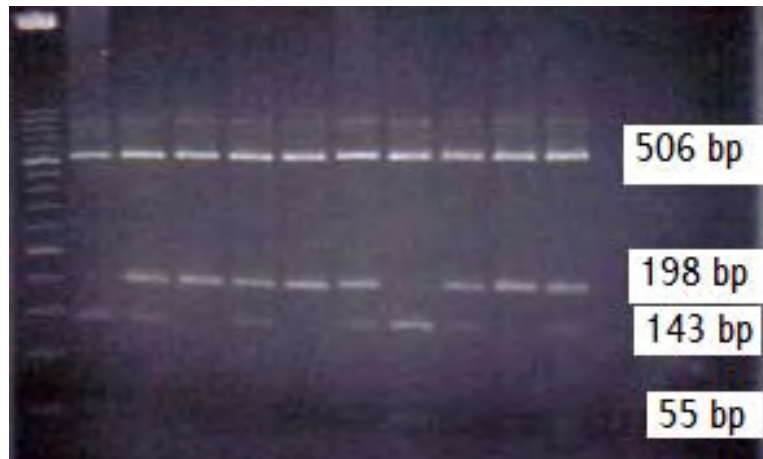


Abbildung 9: Genpolymorphismen des *ATR1* (nach Restriktionsspaltung)

3.4.3.3 Genpolymorphismen der Aldosteron-Synthetase (*CYP11B2*)

Auch hier handelte es sich um eine PCR mit zwei Läufen. Der Mastermix wurde im Prä-PCR-Raum angesetzt. Auch bei dieser nested-PCR wurde nach dem 2.PCR-Lauf ein 1,5%iges Agarose-Gel zur Kontrolle laufen gelassen.

→ Reagentienmix und Temperaturprotokoll siehe Anhang



Abbildung 10: Gelelektrophorese des *CYP11B2* (nach 2.PCR-Lauf)

Das Produkt wurde ebenso mit dem *QIAquick® Purification Kit* gereinigt, mit 30 µl Wasser eluiert und danach ein Restriktionsansatz angefertigt. Der Ansatz wurde bei 6 Stunden bei 37°C verdaut. Das Produkt wurde anschließend auf ein 2,5%iges Agarose-Gel aufgetragen, auch hier mit einer höheren Agarose-Konzentration, damit eine gute Bandenauftrennung möglich war. Das Gel wurde für 4 Stunden an eine Spannungsquelle mit 120 V angeschlossen und danach mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Fragmentlänge des Allels T lag bei 228 bp, 138 bp und 69 bp, die Fragmentlänge des Allels C bei 159 bp, 138 bp, 69 bp und 59 bp.

→ Reagentienmix und Temperaturprotokoll siehe Anhang

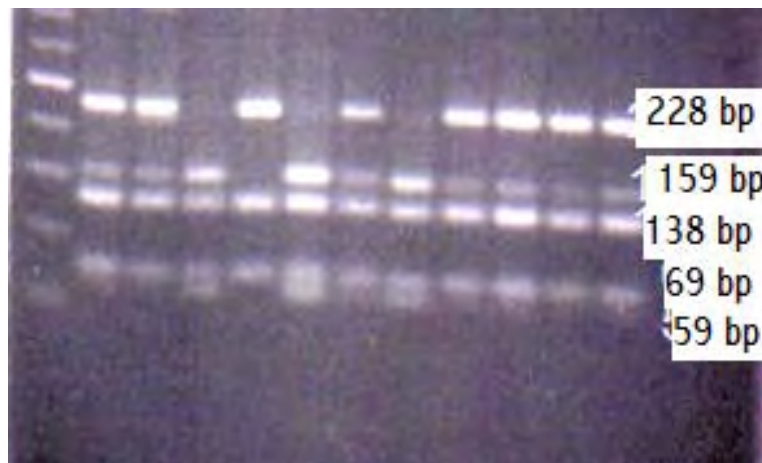


Abbildung 11: Genpolymorphismen des *CYP11B2* (nach Restriktionsspaltung)

3.4.3.4 Genpolymorphismen des Endothelin (EDN1)

Hier handelte es sich ebenfalls um eine nested-PCR. Der Mastermix wurde in der Prä-PCR angesetzt, die DNA bzw. das 1.PCR-Produkt in den Laborräumen hinzu gegeben. Der Erfolg der beiden PCR-Läufe wurde mit einem 1,5%igen Agarose-Gel (Universal-Agarose) kontrolliert.

→ Reagentienmix und Temperaturprotokoll siehe Anhang

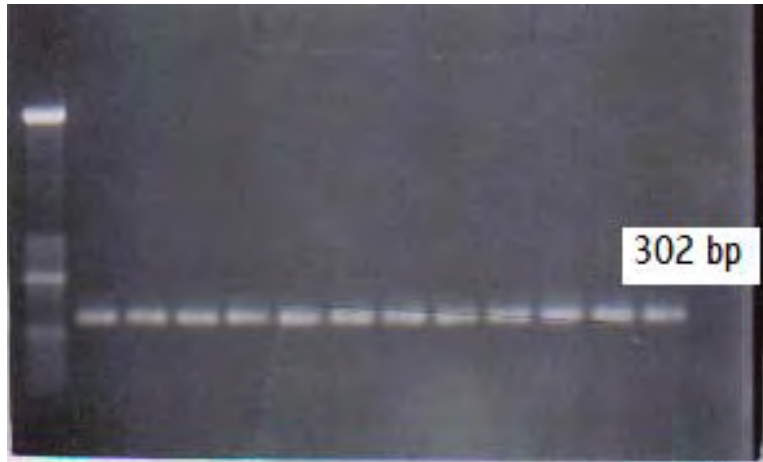


Abbildung 12: Gelelektrophorese des EDN1 (nach 2.PCR-Lauf)

Danach wurde das Produkt mit dem Reinigungs-Kit gereinigt, mit 40 µl Wasser eluiert und schließlich mit dem Enzym Taq I verdaut. Der Verdau lief 6 Stunden bei 65°C. Danach wurde das Produkt auf ein 4,5%iges Agarose-Gel, bestehend aus 4,5 g 3:1-Agarose und 100 ml 10xTAE-Puffer, aufgetragen. Die 3:1-Agarose wurde auf Grund des geringen Fragmentlängenunterschiedes gewählt. Das Gel wurde für 4,5 Stunden an eine Spannungsquelle mit 120 V angeschlossen, danach mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht ausgewertet. Die Fragmentlänge des Allels A betrug 291 bp, die Länge des Allels G 218 bp und 74 bp.

→ Reagentienmix und Temperaturprotokoll siehe Anhang



Abbildung 13: Genpolymorphismen des EDN1 (nach Restriktionsspaltung)

3.4.3.5 Genpolymorphismen der endothelialen NO-Synthase im Exon 7 (NOS3)

Auch hierbei handelte es sich um eine nested-PCR. Nach Beendigung des 2.PCR-Laufes wurde ein Test-Gel angefertigt, um den Erfolg der PCR zu überprüfen. Dazu wurde ein 1,5%iges Universal-Agarose-Gel benutzt.

→ Reagentienmix und Temperaturprotokoll siehe Anhang

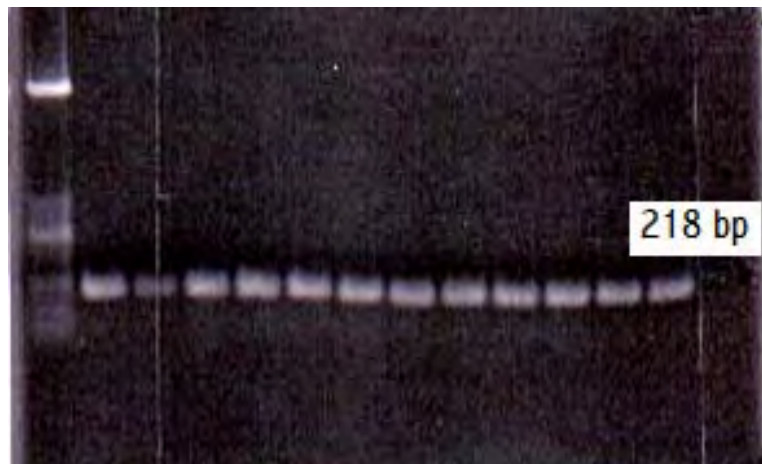


Abbildung 14: Gelelektrophorese des NOS3-Ex7 (nach 2.PCR-Lauf)

Danach wurde das PCR-Produkt mit dem *QIAquick® Purification Kit* gereinigt, mit 30 µl destilliertem Wasser eluiert und mit dem Enzym Nde II verdaut. Der Verdau lief 16 Stunden bei 37°C. Danach wurde das Produkt auf ein 2,5%iges Agarose-Gel aufgetragen und 4 Stunden bei 120 V laufen gelassen. Die Fragmentlänge des Allel G lag bei 218 bp, die des Allel T bei 129 bp und bei 89 bp.

→ Reagentienmix und Temperaturprotokoll siehe Anhang

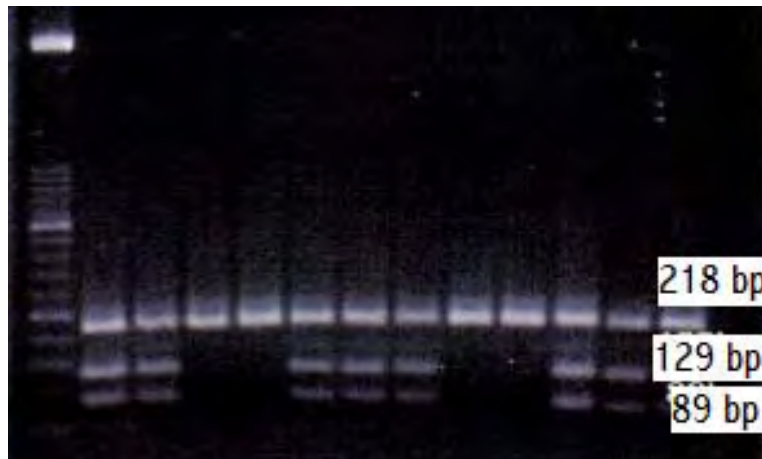


Abbildung 15: Genpolymorphismen des NOS3-Ex7 (nach Restriktionsspaltung)

3.4.3.6 Genpolymorphismen des G-Protein/ β 3-Untereinheit (GNB3)

Hierbei handelte es sich ebenfalls um PCR mit zwei PCR-Läufen. Nachdem der Mastermix in der Prä-PCR angesetzt wurde, wurde im Laborraum die DNA bzw. das Produkt in die einzelnen Cups hinzu gegeben. Nach dem 2.PCR-Lauf wurde zur Kontrolle ein 1,5%iges Universal-Agarose-Gel laufengelassen.

→ Reagentienmix und Temperaturprotokoll siehe Anhang

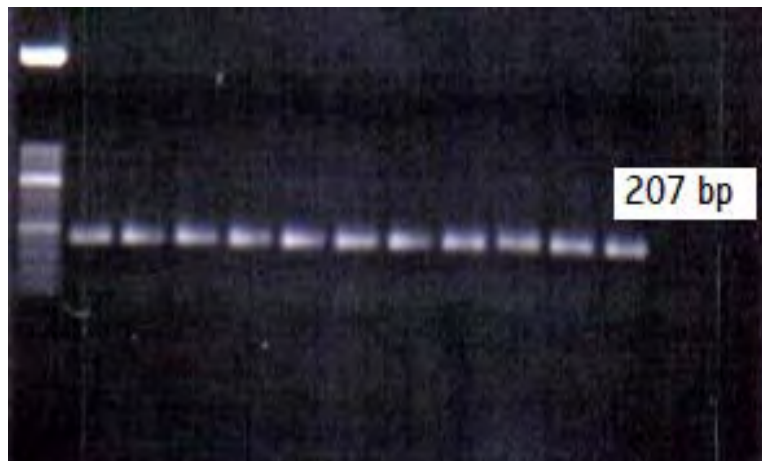


Abbildung 16: Gelelektrophorese des GNB3 (nach 2.PCR-Lauf)

Das Produkt wurde mit dem *QIAquick® Purification Kit* gereinigt, mit 20 μ l Wasser eluiert und mit dem Enzym BsaJ I verdaut. Das Produkt wurde 8 Stunden bei 60°C verdaut. Danach wurde es auf ein 4,5%iges Universal-Agarose-Gel aufgetragen und für 4,5 Stunden an eine Spannungsquelle mit 120

V angeschlossen. Die Fragmentlänge des Allels T lag bei 188 bp, die des Allels C bei 116 bp sowie bei 76 bp.

→ Reagentienmix und Temperaturprotokoll siehe Anhang

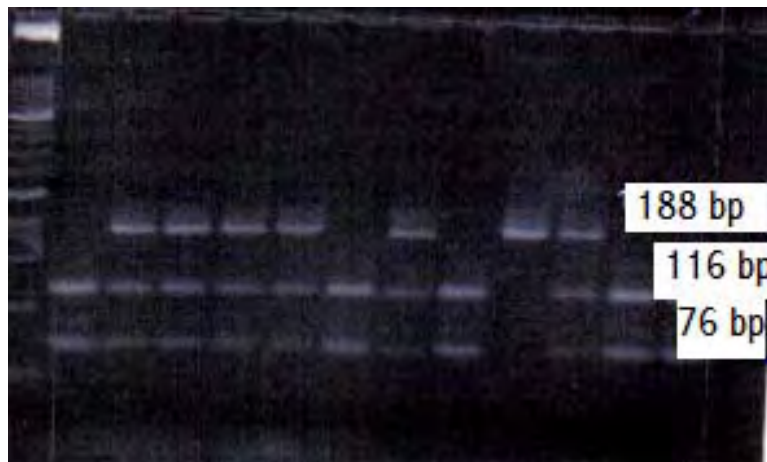


Abbildung 17: Genpolymorphismen des GNB3 (nach Restriktionsspaltung)

3.4.4 Automatisch lasergestützte Fragmentlängenanalyse

Nachdem mit Hilfe einer PCR die DNA ausreichend oft vervielfältigt wurde, kann die Fragmentlänge bestimmt werden. Die PCR muss dafür mit einem fluoreszenzmarkierten Primer durchgeführt werden. Das Sortieren der Fragmente nach der Größe und das Detektieren des Farbstoffes erfolgt durch ein Sequenzier-Gerät vollautomatisch. Im Gerät befinden sich dünne Kapillaren, welche die DNA-Fragmente durchwandern, nachdem eine elektrische Spannung von mehreren hundert Volt angelegt wurde. Kleinere und somit kürzere DNA-Fragmente durchwandern die Kapillaren schneller als längere und größere Fragmente, so dass am Kapillarende alle Fragmente exakt nach der Größe sortiert einen Laserstrahl passieren. Dieser erkennt die Fragmente anhand ihrer Farbmarkierung. Ein fluoreszenzmarkiertes DNA-Fragment wird von dem Laser zur Sekundärstrahlung angeregt, welche durch eine Linse fokussiert und über einen Photomultiplier in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Dieses Signal wird an einen angeschlossenen Computer übertragen. Mit Hilfe eines Computerprogramms wird dieses Messergebnis mit einem parallel gemessenen, internen Längenstandard, bestehend aus DNA-

Abschnitten bekannter Fragmente, verglichen und so in eine DNA-Fragmentlänge übersetzt. Die Fragmentlänge wird in der Einheit Basenpaare (bp) angegeben und reflektiert die Anzahl der wiederholten Einheiten.

3.4.4.1 Genpolymorphismen des Fibrillin-1 (FBN1)

Zum Nachweis der Genpolymorphismen des Fibrillin-1 wurde die Methode der Fragmentlängenanalyse benutzt. Dafür wurde neben einem spezifischen reverse-Primer ein fluoreszenzmarkierter forward-Primer benötigt. Als Farbstoff diente 6-Carboxyfluoreszin (FAM) am 5'-Ende des Oligonukleotids. Nach Beendigung der PCR wurde in den Laborräumen der Analysemix angesetzt, in eine 96-well-plate pipettiert und das PCR-Produkt hinzu gegeben. Die Analyse wurde im *ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer* durchgeführt. Vor Beginn der Fragmentlängenanalyse mussten die beiden Pufferreservoirs mit insgesamt 25 ml 1xSequenzier-Puffer und die Spritzen mit dem Polymer gefüllt werden. Die Ergebnisse wurden mit dem Computerprogramm *GeneScan Analysis®* ausgewertet. Allel I hatte eine Fragmentlänge von 176 bp, Allel II von 171 bp, Allel III von 166 bp und Allel IV von 161 bp.

→ Reagentienmix und Temperaturprotokoll siehe Anhang

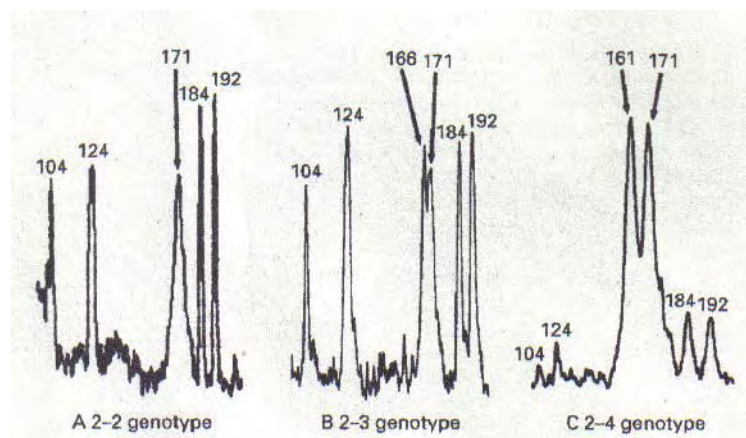


Abbildung 18: Durch die Fragmentlängenanalyse bestimmte Genotypen des Fibrillin-1. [Powell et al., 1997]

3.4.5

Allelic Discrimination

Dieses Verfahren wird mit Hilfe des *ABI Prism[®] 7700 Sequence Detector* durchgeführt. Für die Reaktion sind zwei Primer und zwei für die beiden Allele spezifische DNA-Sonden erforderlich. Diese Sonden entsprechen Oligonukleotiden, welche zum DNA-Abschnitt um die polymorphe Stelle komplementär sind. Sie werden mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, einem Reporterfarbstoff am 5'-Ende und einem Quencherfarbstoff am 3'-Ende, markiert. Die beiden allelspezifischen Sonden werden mit zwei verschiedenen Reporterfarbstoffen, FAM und VIC, und einem identischen Quencherfarbstoff, TAMRA, markiert. Ist die Sonde intakt, verringert die Nähe des Reporter- zum Quencherfarbstoff die Fluoreszenz des Reporters. Die Taq-Polymerase besitzt eine 5'→3'-Exonuklease-Aktivität, die während der PCR eine an die DNA hybridisierte Sonde schneidet. Dieses Schneiden führt zu einer räumlichen Trennung der beiden Farbstoffe an den Enden der Sonde und zu einer Fluoreszenzerhöhung des Reporterfarbstoffes. Die PCR wird danach fortgesetzt. Die Auswertung erfolgt durch die allelspezifischen Fluoreszenzsignale mit Hilfe eines Computerprogramms.

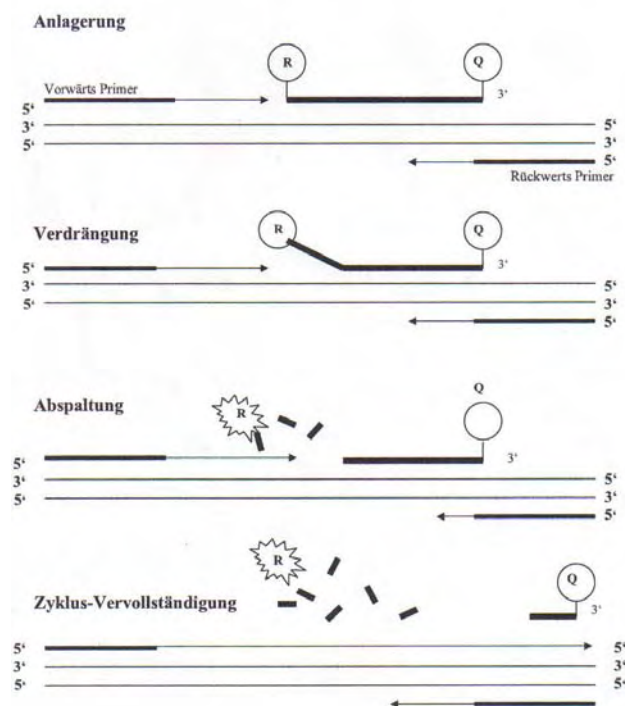


Abbildung 19: Grundlegendes Prinzip des TaqMan-Verfahrens [Lyamichev et al., 1993]

3.4.5.1 Genpolymorphismen der adrenergen β_1 -Rezeptoren (ARDB1, c.145A>G)

Die Sonde für das Allel A wurde mit FAM, die Sonde für das Allel G mit VIC am 5'-End markiert. Das 3'-Ende trug jeweils den Farbstoff TAMRA.

Der Reaktionslösung, bestehend aus 2xTaqMan Universal PCR Mastermix, Sonden, Primern und destilliertem Wasser, wurde in den Laborräumen angesetzt. Die Anordnung der Proben auf der 96-well-plate ist dem Belegungsplan zu entnehmen. Zunächst wurde in die ersten 8 Löcher ein FAM-Standard pipettiert, in die nächsten 8 Löcher ein VIC-Standard. Dann folgten 8 Löcher Wasser. Schließlich wurde die Reaktionslösung mit der Patienten-DNA in die Löcher pipettiert. Jeder Patient belegte 3 Löcher. Pro Platte konnten demnach 24 Patienten mit unbekanntem Genotyp bestimmt werden. Die beiden Standards wurden aus Kontroll-DNA von Patienten aus der Blutbank gewonnen, die sich nach Ablauf einer PCR als homozygot für das bestimmte Allel herausstellten. Das PCR-Produkt wurde gereinigt und spektralphotometrisch bei 260 nm gemessen. Danach wurde eine Verdünnung mit Wasser auf 2×10^{-8} pmol/ μ l angefertigt.

→ Reagentienmix und Temperaturprotokoll siehe Anhang

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	VIC	VIC	VIC	VIC
B	VIC	VIC	VIC	VIC	W	W	W	W	W	W	W	W
C	Pat1	Pat1	Pat1	Pat2	Pat2	Pat2	Pat3	Pat3	Pat3	Pat4	Pat4	Pat4
D	Pat5	Pat5	Pat5	Pat6	Pat6	Pat6	Pat7	Pat7	Pat7	Pat8	Pat8	Pat8
E	Pat9	Pat9	Pat9	Pat10	Pat10	Pat10	Pat11	Pat11	Pat11	Pat12	Pat12	Pat12
F	Pat13	Pat13	Pat13	Pat14	Pat14	Pat14	Pat15	Pat15	Pat15	Pat16	Pat16	Pat16
G	Pat17	Pat17	Pat17	Pat18	Pat18	Pat18	Pat19	Pat19	Pat19	Pat20	Pat20	Pat20
H	Pat21	Pat21	Pat21	Pat22	Pat22	Pat22	Pat23	Pat23	Pat23	Pat24	Pat24	Pat24

Abbildung 20: Belegungsplan der 96-wells-plate

Sowohl PCR als auch Endpunktbstimmung wurde mit Hilfe des TaqMan durchgeführt und mit dem Computerprogramm *Sequence Detector*[®] ausgeführt.

3.4.5.2 Genpolymorphismen der adrenergen β_2 -Rezeptoren (ARDB2)

Wie bereits erwähnt wurden bislang zwei verschiedene Genpolymorphismen der β_2 -Rezeptoren mit einer pathologischen Blutdruckreaktion assoziiert

(ARDB2, c.46A>G, ARDB2, c.79C>G). Beide Polymorphismen sind im Exon 1 des Gens lokalisiert.

3.4.5.2.1 Nachweis des ARDB2, c.46A>G

Die Sonde für das Allel A wurde mit FAM, die Sonde für das Allel G mit VIC am 5'-Ende markiert. Das 3'-Ende trug jeweils den Farbstoff TAMRA.

→ Reagentienmix und Temperaturprotokoll siehe Anhang

3.4.5.2.2 Nachweis des ARDB2, c.79C>G

Die Sonde für das Allel C wurde mit FAM, die Sonde für das Allel G mit VIC am 5'-Ende markiert. Das 3'-Ende trug jeweils den Farbstoff TAMRA.

→ Reagentienmix und Temperaturprotokoll siehe Anhang

Beide Auswertungen erfolgten mit dem Programm *Sequence Detector*[®].

3.4.5.3 Genpolymorphismen der G-Protein-Rezeptor-Kinase-4γ (GRK4γ)

Die Sonde für das Allel C wurde am 5'-Ende mit FAM, die Sonde für das Allel T mit VIC markiert. Die 3'-Enden trugen den Farbstoff TAMRA.

Das Ansetzen des Master-Mixes und das Pipettieren in eine 96-well-plate erfolgten nach dem gleichen Schema wie bei der Genpolymorphismenbestimmung der β-Rezeptoren. Die Standards wurden ebenfalls aus Patienten-DNA der Blutbank gewonnen, welche sich als homozygot für das jeweilige Allel erwiesen, gereinigt und spektralphotometrisch bei 260 nm gemessen. Danach wurde eine Verdünnung mit Wasser auf 2×10^{-8} pmol/μl angefertigt.

→ Reagentienmix und Temperaturprotokoll siehe Anhang

Das Ergebnis wurde mit dem *Sequence Detector*[®] ausgewertet.

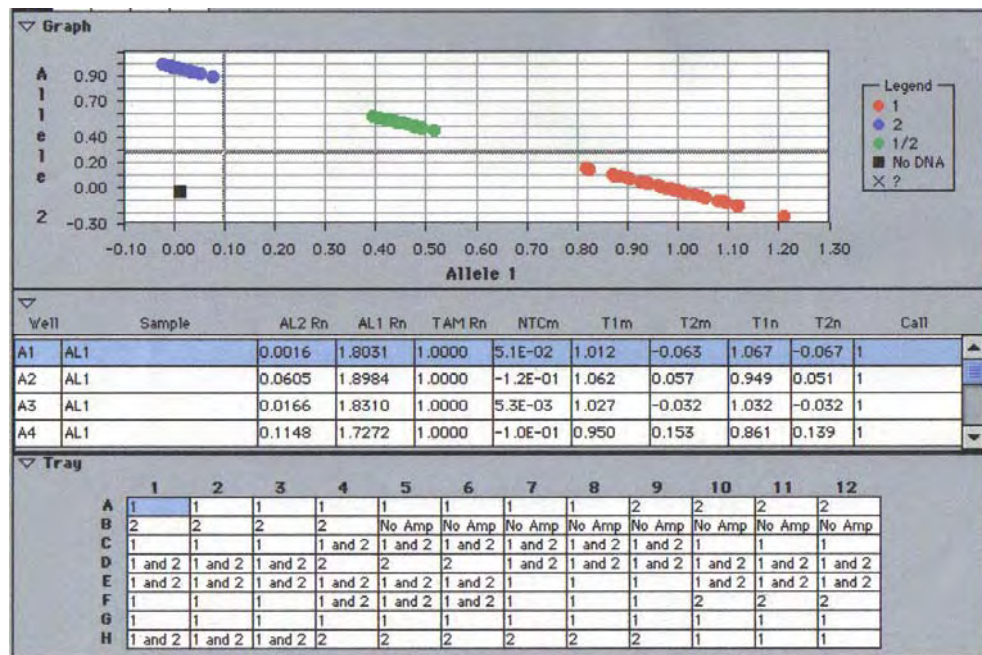


Abbildung 21: Auswertung durch das Computerprogramm Sequence Detector®

- 1 = homozygoter Genotyp für Allel I
- 2 = homozygoter Genotyp für Allel II
- 3 = heterozygoter Genotyp für Allel I/II

3.5

Statistik

Zunächst wurde bei jedem Genpolymorphismus das Hardy-Weinberg-Equilibrium überprüft. Dieses Gesetz sagt aus, dass in einer so genannten „idealen“ Population die prozentuale Häufigkeit, mit der bestimmte Allele in einem Genpool vertreten sind (= Allelhäufigkeit) über die Generationen hinweg unverändert bleiben. Aus diesem Grund vergleicht man die mittels Gesetz von Hardy-Weinberg ermittelten Genotypfrequenzen (erwartet) und tatsächlich erhaltenen Genotypfrequenzen (beobachtet). Im Idealfall sollte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Ergebnissen auftreten. Unter dem Aspekt der primären Fragestellung wurde schließlich mittels χ^2 -Test untersucht, ob bei Patienten mit einer Hypertonie nach Korrektur einer Aortenisthmusstenose eine bestimmte Allelhäufigkeit der Genpolymorphismen vorliegt. Dieses Testvorgehen nutzt man zur Überprüfung der Hypothese, ob zwei Merkmale abhängig bzw. unabhängig voneinander sind. Des Weiteren wurde in sekundären Fragestellungen mittels Kruskal-Wallis-Test geprüft, ob bestimmte Genpolymorphismen einen Einfluss auf das circadiane

Blutdruckverhalten haben, Patienten mit bestimmten Genpolymorphismen häufiger medikamentös vorbehandelt wurden und ob die untersuchten Polymorphismen einen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit haben. Dieser Test ist ein parameterfreier statistischer Test, mit dem im Rahmen einer Varianzanalyse verglichen wird, ob sich verschiedene voneinander unabhängige Stichproben von einer Variablen unterscheiden.

4 ERGEBNISSE

4.1 Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)

	I/I	D/I	D/D	Gesamt
Hypertonie ja	12	26	12	50
nein	19	39	18	76
Gesamt	31	65	30	126

Tabelle 1: Anzahl der hypertonen Patienten und ihre ACE-Genpolymorphismen

Hardy-Weinberg-Test (Fischer Exact)	p=0,859
--	---------

Tabelle 2: Ergebnis des Hardy-Weinberg-Tests

4.1.1 Ergebnis der primären Fragestellung

	χ^2	df	P
Pearson's-Test	0,016	2	0,992

Tabelle 3: Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests

→ Es konnte **kein** Zusammenhang zwischen der Allelhäufigkeit und einem pathologischem Blutdruckverhalten festgestellt werden.

4.1.2 Ergebnisse der sekundären Fragestellungen

	χ^2	Df	p
Gradient	4,58	2	0,101
RR24syst	0,863	2	0,650
RR24diast	0,434	2	0,805
RR24mean	0,667	2	0,717

RRTag-syst	1,186	2	0,553
RRTag-diast	0,304	2	0,859
RRTag-mean	0,9	2	0,638
RRNacht-syst	3,468	2	0,177
RRNacht-diast	0,287	2	0,866
RRNacht-mean	1,109	2	0,574
Dipping	9,056	2	0,011
RRBelastung	0,776	2	0,678
Medikation	0,967	2	0,616
Leistung*	1,581	2	0,454

* Wattzahl in Relation zum Normwert

Tabelle 4: Ergebnisse der einzelnen Kruskal-Wallis-Tests

→ Patienten mit dem Genotyp I/I haben einen geringeren nächtlichen Blutdruckabfall ($p=0,011$). Zwischen allen anderen Variablen und den Allelhäufigkeiten konnte kein Zusammenhang festgestellt werden.

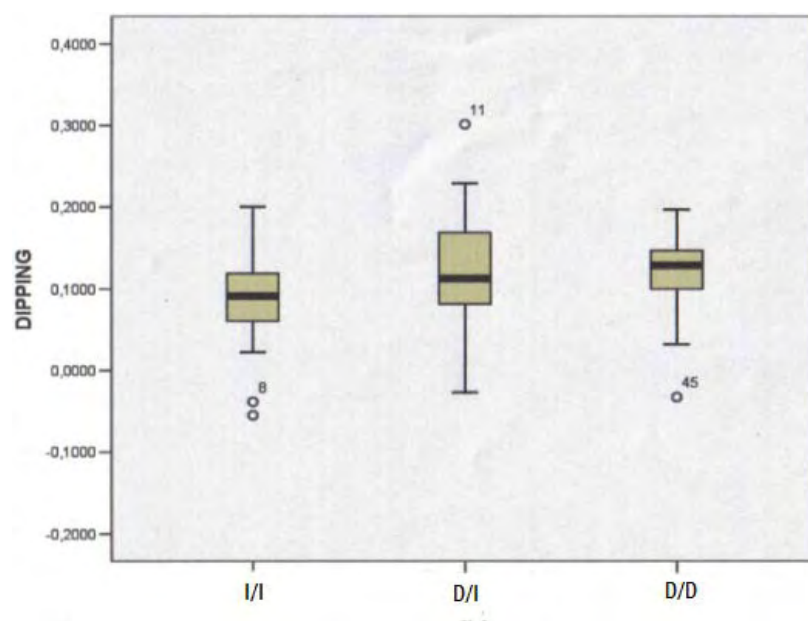


Abbildung 22: Patienten mit dem Genotyp I/I haben ein geringeres Dipping

4.2 Angiotensinogen (AGT)

	C/C	C/T	T/T	gesamt
Hypertonie ja	12	21	17	50
Nein	21	31	24	76
Gesamt	33	52	41	126

Tabelle 5: Anzahl der hypertonen Patienten und ihre AGT-Genpolymorphismen

Hardy-Weinberg-Test (Fischer Exact)	p=0,7261
--	----------

Tabelle 6: Ergebnis des Hardy-Weinberg-Tests

4.2.1 Ergebnis der primären Fragestellung

	χ^2	Df	P
Pearson's-Test	0,217	2	0,897

Tabelle 7: Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests

→ Es konnte **kein** Zusammenhang zwischen der Allelhäufigkeit und einem pathologischem Blutdruckverhalten festgestellt werden.

4.2.2 Ergebnisse der sekundären Fragestellungen

	χ^2	Df	p
Gradient	3,266	2	0,195
RR24syst	2,502	2	0,286
RR24diast	0,716	2	0,699
RR24mean	1,911	2	0,385
RRTag-syst	2,819	2	0,244
RRTag-diast	0,634	2	0,728
RRTag-mean	2,568	2	0,277

RRNacht-syst	1,676	2	0,432
RRNacht-diast	0,453	2	0,797
RRNacht-mean	0,701	2	0,704
Dipping	2,245	2	0,326
RRBelastung	0,437	2	0,804
Medikation	0,216	2	0,898
Leistung*	3,900	2	0,142

* Wattzahl in Relation zum Normwert

Tabelle 8: Ergebnisse der einzelnen Kruskal-Wallis-Tests

→ Es konnte **kein** signifikanter Zusammenhang zwischen den einzelnen Variablen und einem bestimmten AGT-Genpolymorphismus nachgewiesen werden.

4.3 Endotheliale NO-Synthase im Intron 4 (NOS3)

	C/C	C/T	T/T	gesamt
Hypertonie ja	3	20	27	50
Nein	1	25	50	76
Gesamt	4	45	77	126

Tabelle 9: Anzahl der hypertonen Patienten und ihre NOS3-In4-Genpolymorphismen

Hardy-Weinberg-Test (Fischer Exact)	p=0,5909
--	----------

Tabelle 10: Ergebnis des Hardy-Weinberg-Tests

4.3.1 Ergebnis der primären Fragestellung

	χ^2	Df	P
Pearson's-Test	3,197	2	0,202

Tabelle 11: Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests

→ Es konnte **kein** Zusammenhang zwischen der Allelhäufigkeit und einem pathologischem Blutdruckverhalten festgestellt werden.

4.3.2 Ergebnis der sekundären Fragestellungen

	χ^2	Df	P
Gradient	0,762	2	0,683
RR24syst	0,293	2	0,864
RR24diast	0,702	2	0,704
RR24mean	1,406	2	0,495
RRTag-syst	0,97	2	0,95
RRTag-diast	0,896	2	0,639
RRTag-mean	1,557	2	0,459
RRNacht-syst	2,551	2	0,279
RRNacht-diast	0,444	2	0,801
RRNacht-mean	1,270	2	0,530
Dipping	3,975	2	0,137
RRBelastung	1,327	2	0,515
Medikation	1,792	2	0,408
Leistung*	4,218	2	0,121

* Wattzahl in Relation zum Normwert

Tabelle 12: Ergebnisse der einzelnen Kruskal-Wallis-Tests

→ Die einzelnen Parameter korrelieren mit **keinem** bestimmten NOS3-In4-Genpolymorphismus.

4.4 Angiotensin II-Rezeptor Typ-1 (ATR1)

	C/C	C/A	A/A	Gesamt
Hypertonie ja	3	21	26	50
Nein	6	35	35	76
Gesamt	9	56	61	126

Tabelle 13: Anzahl der hypertonen Patienten und ihre ATR1-Genpolymorphismen

Hardy-Weinberg-Test (Fischer Exact)	p=0,522
--	---------

Tabelle 14: Ergebnis des Hardy-Weinberg-Tests

4.4.1 Ergebnis der primären Fragestellung

	χ^2	Df	P
Pearson's-Test	3,197	2	0,202

Tabelle 15: Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests

→ Es konnte **kein** Zusammenhang zwischen der Allelhäufigkeit und einem pathologischem Blutdruckverhalten festgestellt werden.

4.4.2 Ergebnis der sekundären Fragestellungen

	χ^2	Df	P
Gradient	2,171	2	0,338
RR24syst	0,623	2	0,732
RR24diast	1,361	2	0,506
RR24mean	1,830	2	0,400

RRTag-syst	0,791	2	0,673
RRTag-diast	1,777	2	0,411
RRTag-mean	1,780	2	0,411
RRNacht-syst	1,480	2	0,477
RRNacht-diast	1,981	2	0,371
RRNacht-mean	2,700	2	0,259
Dipping	4,262	2	0,119
RRBelastung	1,589	2	0,452
Medikation	2,451	2	0,294
Leistung*	2,594	2	0,273

* Wattzahl in Relation zum Normwert

Tabelle 16: Ergebnisse der einzelnen Kruskal-Wallis-Tests

→ **Keiner** der Variablen steht mit einem bestimmten ATR1-Genpolymorphismus in einem signifikanten Zusammenhang.

4.5 Aldosteron-Synthetase (CYP11B2)

	T/T	T/C	C/C	Gesamt
Hypertonie ja	11	33	6	50
Nein	13	49	14	76
Gesamt	24	82	20	126

Tabelle 17: Anzahl der hypertonen Patienten und ihre CYP11B2-Genpolymorphismen

Hardy-Weinberg-Test (Fischer Exact)	p=0,001214
--	------------

Tabelle 18: Ergebnis des Hardy-Weinberg-Tests

4.5.1 Ergebnis der primären Fragestellung

	χ^2	df	P
Pearson's-Test	1,174	2	0,556

Tabelle 19: Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests

→ Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Allelhäufigkeit und einem pathologischem Blutdruckverhalten festgestellt werden.

4.5.2 Ergebnis der sekundären Fragestellungen

	χ^2	df	P
Gradient	1,019	2	0,601
RR24syst	0,897	2	0,639
RR24diast	0,289	2	0,865
RR24mean	0,115	2	0,944
RRTag-syst	0,897	2	0,638
RRTag-diast	0,313	2	0,855
RRTag-mean	0,070	2	0,966
RRNacht-syst	0,967	2	0,617
RRNacht-diast	0,684	2	0,710
RRNacht-mean	0,540	2	0,763
Dipping	2,546	2	0,280
RRBelastung	2,757	2	0,252
Medikation	1,833	2	0,400
Leistung*	0,139	2	0,933

* Wattzahl in Relation zum Normwert

Tabelle 20: Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests

→ Es besteht **kein** Zusammenhang zwischen einem CYP11B2-Genpolymorphismus und den einzelnen Parametern.

4.6 Endothelin (EDN1)

	G/G	G/A	A/A	Gesamt
Hypertonie ja	20	24	6	50
Nein	36	33	7	76
Gesamt	56	57	13	126

Tabelle 21: Anzahl der hypertonen Patienten und ihre EDN-1-Genpolymorphismen

Hardy-Weinberg-Test (Fischer Exact)	p=1,0
--	-------

Tabelle 22: Ergebnis des Hardy-Weinberg-Tests

4.6.1 Ergebnis der primären Fragestellung

	χ^2	Df	P
Pearson's-Test	0,736	2	0,692

Tabelle 23: Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests

→ Es konnte **kein** Zusammenhang zwischen der Allelhäufigkeit und einem pathologischem Blutdruckverhalten festgestellt werden.

4.6.2 Ergebnis der sekundären Fragestellungen

	χ^2	df	p
Gradient	0,701	2	0,704
RR24syst	1,960	2	0,375
RR24diast	1,071	2	0,585
RR24mean	0,323	2	0,851

RRTag-syst	2,338	2	0,311
RRTag-diast	0,479	2	0,787
RRTag-mean	0,162	2	0,922
RRNacht-syst	0,276	2	0,871
RRNacht-diast	4,605	2	0,100
RRNacht-mean	1,906	2	0,386
Dipping	1,359	2	0,507
RRBelastung	1,227	2	0,542
Medikation	1,800	2	0,407
Leistung*	0,231	2	0,899

* Wattzahl in Relation zum Normwert

Tabelle 24: Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests

→ Es konnte **kein** signifikanter Zusammenhang zwischen bestimmten Genpolymorphismen des EDN-1 und einzelnen Variablen festgestellt werden.

4.7 Endotheliale NO-Synthase im Exon 7 (NOS3)

	G/G	G/T	T/T	Gesamt
Hypertonie ja	27	19	4	50
Nein	25	41	10	76
Gesamt	52	60	14	126

Tabelle 25: Anzahl der hypertonen Patienten und ihre NOS3-Ex7-Genpolymorphismen

Hardy-Weinberg-Test (Fischer Exact)	p=0,6964
--	----------

Tabelle 26: Ergebnis des Hardy-Weinberg-Tests

4.7.1 Ergebnis der primären Fragestellung

	χ^2	Df	P
Pearson's-Test	5,588	2	0,061

Tabelle 27: Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests

→ Es konnte **kein** signifikanter Zusammenhang zwischen Hypertonie und einer bestimmten Allelhäufigkeit des NOS3-Ex7 festgestellt werden.

4.7.2 Ergebnis der sekundären Fragestellungen

	χ^2	df	p
Gradient	2,409	2	0,300
RR24syst	2,158	2	0,340
RR24diast	2,788	2	0,248
RR24mean	3,816	2	0,148
RRTag-syst	1,979	2	0,372
RRTag-diast	2,888	2	0,236
RRTag-mean	3,436	2	0,179
RRNacht-syst	2,236	2	0,327
RRNacht-diast	5,912	2	0,052
RRNacht-mean	4,985	2	0,083
Dipping	1,059	2	0,589
RRBelastung	5,280	2	0,071
Medikation	0,692	2	0,707
Leistung*	0,293	2	0,864

* Wattzahl in Relation zum Normwert

Tabelle 28: Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests

→ Es besteht **kein** signifikanter Zusammenhang zwischen NOS3-Ex7 und den untersuchten Parametern.

4.8 G-Protein/ β 3-Untereinheit (GNB3)

	C/C	C/T	T/T	Gesamt
Hypertonie ja	22	22	6	50
Nein	34	28	14	76
Gesamt	56	50	20	126

Tabelle 29: Anzahl der hypertonen Patienten und ihre GNB3-Genpolymorphismen

Hardy-Weinberg-Test (Fischer Exact)	p=0,3437
--	----------

Tabelle 30: Ergebnis des Hardy-Weinberg-Tests

4.8.1 Ergebnis der primären Fragestellung

	χ^2	df	P
Pearson's-Test	1,176	2	0,555

Tabelle 31: Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests

→ Es besteht **kein** signifikanter Zusammenhang zwischen pathologischem Blutdruckverhalten und einer GNB3-Allelhäufigkeit.

4.8.2 Ergebnis der sekundären Fragestellungen

	χ^2	df	p
Gradient	3,101	2	0,212
RR24syst	1,655	2	0,437
RR24diast	0,250	2	0,883
RR24mean	1,524	2	0,467

RRTag-syst	1,332	2	0,514
RRTag-diast	0,102	2	0,950
RRTag-mean	0,978	2	0,613
RRNacht-syst	4,497	2	0,106
RRNacht-diast	1,981	2	0,371
RRNacht-mean	4,186	2	0,123
Dipping	2,286	2	0,319
RRBelastung	2,065	2	0,356
Medikation	2,131	2	0,345
Leistung*	0,172	2	0,918

* Wattzahl in Relation zum Normwert

Tabelle 32: Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests

→ Es konnte **kein** Zusammenhang zwischen den Genpolymorphismen des GNB3 und den einzelnen Variablen nachgewiesen werden.

4.9 Fibrillin-1 (FBN1)

	1/2	2/2	2/3	2/4	3/3	3/4	4/4	Gesamt
Hypertonie ja	1	32	7	6	2	0	2	50
nein	0	51	9	13	0	2	1	76
Gesamt	1	83	16	19	2	2	3	126

Tabelle 33: Anzahl der hypertonen Patienten und ihre FBN-1-Genpolymorphismen

Hardy-Weinberg-Test (Fischer Exact)	p=0,3608
--	----------

Tabelle 34: Ergebnis des Hardy-Weinberg-Tests

4.9.1 Ergebnis der primären Fragestellung

	χ^2	df	P
Pearson's-Test	7,464	2	0,280

Tabelle 35: Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests

→ Es konnte **kein** signifikanter Zusammenhang zwischen Hypertonie und einem FBN-1-Genpolymorphismus nachgewiesen werden.

4.9.2 Ergebnisse der sekundären Fragestellungen

	χ^2	df	p
Gradient	3,854	6	0,696
RR24syst	4,881	6	0,559
RR24diast	5,808	6	0,445
RR24mean	5,926	6	0,431
RRTag-syst	5,519	6	0,479
RRTag-diast	6,527	6	0,367
RRTag-mean	8,226	6	0,222
RRNacht-syst	0,799	6	0,992
RRNacht-diast	8,023	6	0,236
RRNacht-mean	2,348	6	0,885
Dipping	8,330	6	0,215
RRBelastung	5,216	6	0,516
Medikation	5,913	6	0,433
Leistung*	1,942	6	0,925

* Wattzahl in Relation zum Normwert

Tabelle 36: Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests

→ Es besteht **kein** signifikanter Zusammenhang zwischen den klinischen Daten und einem bestimmten FIB-1-Genpolymorphismus.

4.10 β_1 -Rezeptoren (ADRB1 c.145A>G)

	A/A	A/G	G/G	Gesamt
Hypertonie ja	35	15	0	50
Nein	58	18	0	76
Gesamt	93	33	0	126

Tabelle 37: Anzahl der hypertonen Patienten und ihre ADRB1, c.145A>G-Genpolymorphismen

Hardy-Weinberg-Test (Fischer Exact)	p=0,1269
--	----------

Tabelle 38: Ergebnis des Hardy-Weinberg-Tests

4.10.1 Ergebnis der primären Fragestellung

	χ^2	Df	P
Pearson's-Test	0,622	2	0,430

Tabelle 39: Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests

→ Es besteht **kein** signifikanter Zusammenhang zwischen pathologischem Blutdruckverhalten und einer ADRB1, c.145A>G-Allelhäufigkeit.

4.10.2 Ergebnisse der sekundären Fragestellung

	χ^2	df	p
Gradient	7,049	1	0,008
RR24syst	0,052	1	0,820
RR24diast	0,176	1	0,675

RR24mean	0,043	1	0,835
RRTag-syst	0,115	1	0,735
RRTag-diast	0,052	1	0,820
RRTag-mean	0,064	1	0,800
RRNacht-syst	0,004	1	0,949
RRNacht-diast	0,510	1	0,475
RRNacht-mean	0,145	1	0,704
Dipping	0,339	1	0,560
RRBelastung	0,425	1	0,514
Medikation	0,750	1	0,386
Leistung*	0,078	1	0,780

* Wattzahl in Relation zum Normwert

Tabelle 40: Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests

→ Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Genotyp 145A/145A und einem höheren Restgradienten.

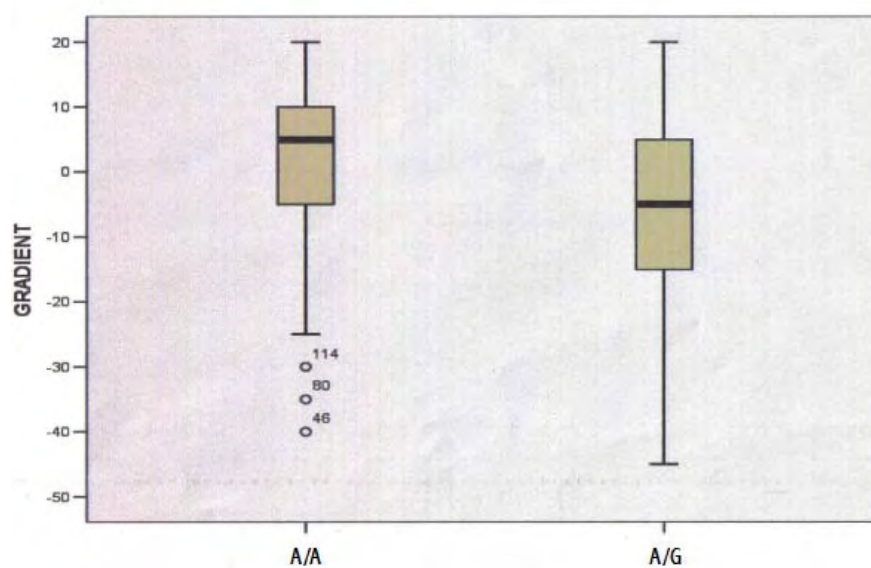


Abbildung 23: Patienten mit dem 145A/145A-Genotyp haben einen höheren Restgradienten

4.11 β_2 -Rezeptoren

4.11.1 ADRB2, c.46A>G

	A/A	A/G	G/G	Gesamt
Hypertonie ja	8	17	25	50
nein	14	37	25	76
Gesamt	22	54	50	126

Tabelle 41: Anzahl der hypertonen Patienten und ihre ADRB2, c.46A>G-Genpolymorphismen

Hardy-Weinberg-Test (Fischer Exact)	P=0,2655
--	----------

Tabelle 42: Ergebnis des Hardy-Weinberg-Tests

4.11.1.1 Ergebnis der primären Fragestellung

	χ^2	df	P
Pearson's-Test	3,842	2	0,146

Tabelle 43: Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests

→ Es besteht **kein** signifikanter Zusammenhang zwischen pathologischem Blutdruckverhalten und einer ADRB2, c.46A>G-Allelhäufigkeit.

4.11.1.2 Ergebnisse der sekundären Fragestellungen

	χ^2	df	p
Gradient	2,104	2	0,349
RR24syst	0,906	2	0,636
RR24diast	3,063	2	0,216
RR24mean	0,967	2	0,617
RRTag-syst	1,202	2	0,548
RRTag-diast	3,397	2	0,183

RRTag-mean	2,337	2	0,311
RRNacht-syst	1,582	2	0,453
RRNacht-diast	0,394	2	0,821
RRNacht-mean	0,758	2	0,684
Dipping	3,974	2	0,137
RRBelastung	0,927	2	0,629
Medikation	5,828	2	0,054
Leistung*	8,586	2	0,014

* Wattzahl in Relation zum Normwert

Tabelle 44: Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests

→ Patienten mit dem Genotyp 46G/46G zeigen die höchste Leistungsfähigkeit.

Modell	Nicht-standard. Koeffizienten		Standard. Koeffizienten	T-Wert	Signifikanz
	B	Standard-Fehler	Beta		
Konstante	-0,324	0,324		-1,001	0,319
Geschlecht	0,123	0,033	0,446	3,752	0,000
Alter	0,002	0,001	0,150	1,590	0,115
KG	0,001	0,001	0,075	0,667	0,506
KL	0,005	0,002	0,363	2,713	0,008
Konstante	-0,343	0,316		-1,084	0,281
Geschlecht	0,119	0,032	0,429	3,696	0,000
Alter	0,002	0,001	0,166	1,796	0,075
KG	0,000	0,001	0,055	0,494	0,622
KL	0,005	0,002	0,353	2,703	0,008
β2AR,c.46A>G	0,642	0,016	0,221	2,576	0,011

B = Steigung Beta = Standardabweichung bei Berechnung von standardisierten Variablen

Tabelle 45: Multiple Regressionsanalyse mit Berücksichtigung verschiedener Parameter

→ Auch nach Berücksichtigung der Parameter Geschlecht, Alter, Körpergewicht und Körperlänge ergibt sich zwischen Belastungsfähigkeit und ADRB2, c.46A>G ein signifikanter Zusammenhang.

4.11.2 ADRB2, c.79C>G

	C/C	C/G	G/G	Gesamt
Hypertonie ja	19	20	11	50
nein	28	35	13	76
Gesamt	47	55	24	126

Tabelle 46: Anzahl der hypertonen Patienten und ihre ADRB2, c.79C>G-Genpolymorphismen

Hardy-Weinberg-Test (Fischer Exact)	p=0,2733
--	----------

Tabelle 47: Ergebnis des Hardy-Weinberg-Tests

4.11.2.1 Ergebnis der primären Fragestellung

	χ^2	df	P
Pearson's-Test	0,643	2	0,725

Tabelle 48: Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests

→ Es besteht **kein** signifikanter Zusammenhang zwischen Hypertonie und Genpolymorphismen des ADRB2, c.79C>G.

4.11.2.2 Ergebnisse der sekundären Fragestellungen

	χ^2	df	p
Gradient	1,099	2	0,577
RR24syst	0,240	2	0,887
RR24diast	1,835	2	0,399
RR24mean	0,815	2	0,665

RRTag-syst	0,589	2	0,745
RRTag-diast	1,790	2	0,409
RRTag-mean	2,229	2	0,328
RRNacht-syst	0,546	2	0,761
RRNacht-diast	0,322	2	0,851
RRNacht-mean	0,403	2	0,818
Dipping	2,127	2	0,345
RRBelastung	0,735	2	0,692
Medikation	0,298	2	0,861
Leistung*	2,234	2	0,327

* Wattzahl in Relation zum Normwert

Tabelle 49: Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests

→ Es besteht **kein** signifikanter Zusammenhang zwischen den einzelnen klinischen Parametern und einem Genpolymorphismus des ADRB2, c.79C>G.

4.12 G-Protein-Rezeptor-Kinase-4 γ (GRK4 γ)

	C/C	C/T	T/T	Gesamt
Hypertonie ja	12	32	6	50
Nein	22	42	10	76
Gesamt	34	74	16	126

Tabelle 50: Anzahl der hypertonen Patienten und ihre GRK4 γ -Genpolymorphismen

Hardy-Weinberg-Test (Fischer Exact)	p=0,018
--	---------

Tabelle 51: Ergebnis des Hardy-Weinberg-Tests

4.12.1 Ergebnisse der primären Fragestellung

	χ^2	df	P
Pearson's-Test	0,673	2	0,714

Tabelle 52: Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests

→ Es konnte **kein** signifikanter Zusammenhang zwischen einem pathologischen Blutdruckverhalten und einer Allelhäufigkeit der GRK4 γ festgestellt werden.

4.12.2 Ergebnisse der sekundären Fragestellung

	χ^2	df	p
Gradient	1,159	2	0,560
RR24syst	0,325	2	0,850
RR24diast	0,013	2	0,992
RR24mean	0,108	2	0,947
RRTag-syst	0,164	2	0,921
RRTag-diast	0,754	2	0,686
RRTag-mean	0,018	2	0,991
RRNacht-syst	1,710	2	0,425
RRNacht-diast	0,803	2	0,669
RRNacht-mean	1,393	2	0,498
Dipping	0,464	2	0,793
RRBelastung	0,594	2	0,743
Medikation	0,189	2	0,910
Leistung*	2,163	2	0,339

* Wattzahl in Relation zum Normwert

Tabelle 53: Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests

→ Es besteht **kein** Zusammenhang zwischen einem bestimmten GRK4 γ -Genpolymorphismus und den einzelnen Variablen.

5 DISKUSSION

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Gewinnung genomischer DNA

Bei der Gewinnung von genomischer DNA war es besonders wichtig, Kontaminationen zu vermeiden, sowie sämtliche die PCR hemmende Substanzen zu eliminieren. Bereits 1990 wurden von Innis und Mitarbeitern beschrieben, dass u.a. Heparin, Proteinkinase K sowie Porphyrine eine DNA-Amplifikation inhibieren können [Innis et al., 1990].

In der vorliegenden Arbeit wurde die genomische DNA aus dem Vollblut der Patienten gewonnen. Um eine Koagulation des Blutes zu verhindern, war es nötig, Röhrchen mit EDTA-Zusatz zu benutzen. Heparin-Zusätze wären, wie oben bereits erwähnt, ungeeignet gewesen, da sie auf die DNA-Amplifizierung einen hemmenden Effekt ausgeübt hätten. Dies konnte auch in weiteren Arbeiten gezeigt werden [Holodniy et al., 1991; Yakota et al., 1999] und wurde aus diesem Grund bei unserer Untersuchung berücksichtigt. Für die Extraktion der Erbinformation war dann zunächst ein Proteaseverdau mittels Proteinkinase K notwendig. Proteinkinase K ist ein Enzym, welches denaturierte Proteine abbaut. Da jedoch auch die DNA-Polymerase durch die Proteinkinase K abgebaut werden würde, musste die Proteinkinase vor der PCR durch Inkubation inaktiviert werden. Auch Porphyrinverbindungen haben einen negativen Einfluss auf eine PCR, so dass diese durch Lysierung der Erythrozyten und nachfolgender Abzentrifugation der Leukozyten aus dem Probenansatz entfernt wurden. Es folgten weiterhin zur Reinigung der PCR-Produkte die Aufarbeitung mit verschiedenen Waschpuffern sowie mehrere Zentrifugationsschritte. Zum Schluss konnte die genomische DNA entnommen werden. Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde spektralphotometrisch gemessen.

5.1.2

Direkter Nachweis primär längendifferenzierender PCR-Produkte

Die PCR ist eine Methode, um spezifische DNA-Abschnitte amplifizieren zu können. Benötigt werden dazu synthetisierte Oligonukleotide, die komplementär zu dem DNA-Abschnitt sind, welcher vervielfältigt werden soll. Nachdem sie an ihre Zielsequenz gebunden haben, werden sie von einer DNA-Polymerase verlängert. Dieser Vorgang, die Polymerisation, ist temperaturabhängig. Durch Einsatz einer hitzestabilen DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) wird verhindert, dass die Polymerase ebenfalls denaturiert wird [Innis et al., 1988; Li et al., 1988].

Um sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität der Reaktion erhöhen zu können, wurde in dieser Arbeit, wenn möglich, eine so genannte *nested-PCR* durchgeführt. Sie besteht aus zwei hintereinander geschalteten PCR-Läufen. Im ersten Lauf wird ein größeres Fragment der DNA mittels eines externen Primerpaares amplifiziert. Im zweiten Lauf liegen die internen Primer innerhalb der im ersten Lauf amplifizierten Sequenz. Der Vorteil dieses Verfahrens gegenüber der Standard-PCR ist, dass für das nested-PCR-Produkt das Produkt der ersten Amplifikation als Matrize dient und somit wie oben beschrieben eine Steigerung von Sensitivität gepaart mit Spezifität erreicht werden kann [Jackson et al., 1991]. Zu nennende Nachteile sind allerdings der erhöhte Arbeitsaufwand und die deutlich höheren Materialkosten, außerdem durch die zusätzlichen Arbeitsschritte eine erhöhte Gefahr von Arbeitsfehlern und vor allem Kontaminationen.

5.1.3

Fragmentlängenanalyse und Allelic Discrimination

Beide von uns genutzten Verfahren bauen auf dem Prinzip der Fluoreszenzmarkierung auf. Im Vergleich zu den Standardverfahren der Genpolymorphismen-Analyse, bieten diese neueren Methoden ein weites Spektrum an Vorteilen. Durch die Automatisierung verhelfen beide Verfahren zu einem enormen Zeitersparnis, vor allem zu der Möglichkeit einen großen Satz von Produkten gleichzeitig zu analysieren. Daraus ergibt sich außerdem

eine hohe Messgenauigkeit sowie eine hohe Reproduzierbarkeit. Des Weiteren können die analysierten Daten direkt gespeichert werden. Die Aufbewahrung der Gele entfällt somit, außerdem auch der Umgang mit dem DNA-Interkalator Ethidiumbromid, der stark kanzerogen wirkt, sowie die aufwendige Entsorgung. Nachteile sind wie bei allen teil- oder vollautomatischen Arbeitsschritten die Notwendigkeit einer vergleichsmäßig teuren Geräte- bzw. Hard- und Softwareanschaffung sowie deren Störanfälligkeit.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Zusammenfassend kann zunächst gesagt werden, dass bei unserem Patientenkollektiv, welches nach Operation einer Aortenisthmusstenose eine Hypertonie entwickelte, keine bestimmte Allelhäufigkeit vorliegt. Es konnte keinerlei signifikanter Zusammenhang zwischen den untersuchten Genpolymorphismen und einem arteriellen Bluthochdruck festgestellt werden. Alle Genpolymorphismen wurden hinsichtlich des Hardy-Weinberg-Equilibrium und der danach zu erwarteten Frequenzen geprüft. Außer bei CYP11B2 und GRK4 γ wurde bei allen Polymorphismen das Gesetz erfüllt, das heißt, es liegt dort eine stabile Genverteilung vor. Eine mögliche Erklärung dafür, dass bei CYP11B2 und GRK4 γ das Gesetz nicht erfüllt wurde, könnte ein Selektionsvorteil eines Genotyps sein. Denkbar wäre allerdings auch, dass der Grund in dem relativ kleinen Patientenkollektiv liegt; so gilt das Gesetz vor allem bei großen Populationen.

Da, wie bereits genannt, in einigen Studien Zusammenhänge zwischen einer arteriellen Hypertonie und dem RAAS gezeigt werden konnten, lag unser primäres Augenmerk in erster Linie auf einer Verbindung zwischen der arteriellen Hypertonie nach Aortenisthmusstenose und Genpolymorphismen dieses Systems. Dies konnte leider nicht bestätigt werden.

Da es wie bei dem Bluthochdruck in der allgemeinen Bevölkerung auch bei Patienten mit Aortenisthmusstenose im Gefäßsystem zu Fibrillindegenerationen, Fibrosen und zystischen Medianekrosen kommt [Niwa et al., 2001], haben wir außerdem eine Signifikanz mit dem Fibrillin-

Polymorphismus vermutet. Diese Degenerationen werden bei unseren Patienten bereits im Kindesalter gefunden und auch, was für eine genetische Komponente und gegen eine einfache Degeneration durch eine unerkannte Hypertonie bis zur operativen Korrektur spricht, distal der Engstelle [Isner et al., 1987]. Doch auch hier konnten wir keinen Zusammenhang aufzeigen.

Wegen der unphysiologischen Funktion des peripheren vaskulären Systems bei unseren Patienten hielten wir weiterhin positive Ergebnisse bezüglich arterieller Hypertonie nach Korrektur der Stenose und unseren untersuchten Genpolymorphismen NOS3 und Endothelin für möglich. Allerdings gab es auch hier keinen signifikanten Zusammenhang.

Nachdem die Variable „Arterielle Hypertonie (hypertensiv/normotensiv)“ nun jedoch in die einzelnen Komponenten systolischer/diastolischer Blutdruckwert, mittlerer Wert tagsüber/nachts/über 24 Stunden, Dipping und systolischer Wert bei Belastung zerlegt wurde, konnten einige Signifikanzen gezeigt werden: Zunächst stellten wir fest, dass bei Patienten, die homozygote Träger des I-Allels des ACE-Genotyps sind (I/I), ein geringerer nächtlicher Blutdruckabfall (Dipping) vorliegt (0,011). Damit widersprechen unsere Ergebnisse den bis dato zumeist vorliegenden Resultaten. So zeigten Barkai und Mitarbeiter, dass Patienten mit einem bekannten Diabetes I und einem D/D-Polymorphismus insgesamt sowohl über 24 Stunden einen höheren diastolischen Blutdruck als auch eine geringere nächtliche Blutdruckabsenkung haben [Barkai et al., 2005]. Auch Szadkowska beschreibt einen im Tagesverlauf höheren systolischen, als auch diastolischen Blutdruckwert sowie einen geringeren nächtlichen Blutdruckabfall bei D/D [Szadkowska et al., 2006], ebenso wie Arbeiten über spanische Hypertoniepatienten [Julve et al., 2001] und russische männliche Patienten mit Bluthochdruck [Bagmet et al., 2005]. Eine andere Arbeit über japanische Patienten wiederum konnte gar keinen Zusammenhang zwischen dem ACE-Polymorphismus und arterieller Hypertonie finden [Matsubara et al., 2002].

Ein weiteres interessantes Ergebnis konnten wir bei ADRB1, c.145A>G finden. Patienten mit dem Genpolymorphismus 145A/145A zeigten einen höheren Restgradienten auf. Eine Erklärung für dieses Phänomen liefert möglicherweise die Arbeit von McCaffery und seinen Mitarbeitern (2002). Dort konnte, wie oben bereits erwähnt, gezeigt werden, dass bei Patienten mit

einem A-Allel sowohl systolisch als auch diastolisch erhöhte Blutdruckwerte gemessen werden konnten. Es ist anzunehmen, dass dafür eine Verbesserung der β_1 -Aktivität verantwortlich ist und es dadurch zu einer Erhöhung des Herzzeitvolumens kommt. Kommt es nun bei unseren Patienten mit dem A-Allel zu einer geringen Restenose (Einschlusskriterium war ein Gradient ≤ 20 mmHg) und damit ebenfalls zu einer Erhöhung des HZV, wird über der Coarctation ein höherer Restgradient gemessen.

Zuletzt konnten wir zeigen, dass Patienten mit dem Genotyp 46G/46G des ADRB2, c.46A>G insgesamt die höchste Leistungsfähigkeit besitzen. Dies ist bei genauerer Betrachtung nicht überraschend. Wie u.a. schon Green et al. sowohl 1994 als auch 1995 zeigen konnten, kommt es durch das G-Allel zu einer Downregulation der β_2 -Rezeptoren und zu einem Überwiegen der β_1 -Funktion. Die Leistungsfähigkeit profitiert von der besseren Rezeptorfunktion, so dass Patienten mit dem G-Allel während der Untersuchung höhere Wattzahlen erreichten.

Nun stellt sich jedoch die Frage, warum wir keinen Zusammenhang zwischen einer arteriellen Hypertonie bei Patienten mit korrigierter Aortenisthmusstenose und den untersuchten Genpolymorphismen aufzeigen konnten. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass diese Studie mehrere methodisch bedingte Limitationen besitzt. Insgesamt wurden nur 14 Genpolymorphismen untersucht. Es ist möglich, dass die Genpolymorphismen, die mit einer arteriellen Hypertonie korrelieren, auch untereinander in Verbindung stehen. Deswegen und natürlich weil wir eine Auswahl der verschiedenen Genpolymorphismen treffen mussten, haben wir die Polymorphismen ausgesucht, die in vielen Studien in Bezug auf eine arterielle Hypertonie die häufigsten Signifikanzen aufzeigten. Dennoch muss man anmerken, dass eben wichtige Genpolymorphismen, die eine Rolle in der physiologischen Regulation des Kreislaufsystems und damit auch in der Entwicklung der arteriellen Hypertonie spielen könnten, wie die des Insulinstoffwechsels, der Glukokortikoidsynthese oder des Lipidstoffwechsels, in dieser Studie nicht untersucht wurden.

Kritisch sollte auch das untersuchte Patientenkollektiv betrachtet werden. Es konnten schließlich, wie bei den meisten Studien über angeborene Herzfehler, nur die Patienten untersucht werden, die noch am Leben waren bzw. an den

Untersuchungen teilnehmen konnten und sich auch für diese bereit erklärten. Ein anderer wichtiger Punkt ist mit Sicherheit, dass wir Patienten in einer großen Altersspanne untersucht haben. Niemand kann schließlich voraussagen, welcher der jungen Patienten, die während des Untersuchungszeitpunktes normotensiv waren, später noch eine arterielle Hypertension entwickeln würden.

Die für genetische Assoziationsstudien relativ geringe Zahl an untersuchten Patienten ist eine weitere wichtige Limitation der Studie. Diese bergrenzte Patientenzahl machte es aus statistischen Kriterien unmöglich, den kombinierten blutdrucksteigernden Effekt von bestimmten Allelen differenter Gene, wie z.B. für ADRB2, c.46A>G und NOS3, c.894G>T beschrieben [Minoso et al.; 2009], zu untersuchen.

5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Insgesamt konnten wir bezüglich der primären Fragestellung, ob Patienten, die nach Korrektur einer Aortenisthmusstenose eine arterielle Hypertonie entwickeln, bestimmte Genpolymorphismen tragen, keine Signifikanzen aufzeigen. Die sekundären Fragestellungen lieferten uns dann jedoch einige interessante Ergebnisse, wie ein verminderter nächtlicher Blutdruckabfall bei I/I des ACE-Polymorphismus, ein höherer Restgradient bei 145A/145A des ADRB1 sowie eine gesteigerte Leistungsfähigkeit bei 46G/46G des ADRB2. Es muss trotzdem betont werden, dass diese Ergebnisse zurzeit eher von wissenschaftlichem Interesse und noch ohne klinische Relevanz sind, da sie bislang keine präventiven, prognostischen oder therapeutischen Konsequenzen nach sich ziehen. Die Hoffnung sollte auf der Entdeckung von mehr Genen und deren Polymorphismen liegen, die potentiell für Defekte im Herz-Kreislauf-System verantwortlich sind. Ziel weiterer Untersuchungen bleibt es deshalb, wirkungsvolle Mechanismen für die Prävention, Diagnose, Prognose und das Therapiemanagement solcher Erkrankungen, u.a. der Aortenisthmusstenose, zu finden.

Nach Korrektur einer Aortenisthmusstenose entwickeln viele Patienten eine Hypertonie obwohl keine Restenose vorliegt. Diese Arbeit untersuchte den Einfluss von verschiedenen an der Blutdruckregulation beteiligten Genen und ihren Genpolymorphismen. Primär wurde geprüft, ob bei Patienten mit Aortenisthmusstenose, die im Langzeitverlauf eine Hypertonie entwickelten, eine bestimmte Allelhäufigkeit vorliegt. Des Weiteren wurde hinterfragt, ob ein Zusammenhang zwischen den Genpolymorphismen und der Ausprägung der Hypertonie, dem circadianen Blutdruckverhalten, dem Blutdruckverhalten unter Belastung und der medikamentösen Therapie besteht. Insgesamt wurden 283 Patienten im Rahmen der COALA-Studie im Deutschen Herzzentrum München (DHM) nach untersucht. Neben Anamnese und körperlicher Untersuchung wurde eine Langzeitblutdruckmessung über 24 Stunden und eine Belastungsergometrie durchgeführt. Von 126 Patienten wurde die DNA im kinderkrankardiologischen Labor der Kinderklinik Gießen molekulargenetisch untersucht. Die Genpolymorphismen wurden mittels PCR, Restriktions-Fragmentlängen-Analyse, automatisch lasergestützter Fragmentlängenanalyse und 5'-Nuclease-Assay (Allelic Discrimination) ermittelt. Bestimmt wurden die Genpolymorphismen des RAAS (ACE, AGT, ATR1, CYP11B2), des Endothelin-Systems (EDN1), der endothelialen NO-Synthase (NOS3, Exon7/Intron4), der adrenergen β -Rezeptoren (ADRB1, c.145A>G, ADRB2, c.46A>G, ADRB2, c.79C>G), des G-Proteins (GNB3, GRK4 γ) und des Fibrillin (FBN1). Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten, die nach Korrektur einer Aortenisthmusstenose eine Hypertonie entwickeln, kein bestimmter Genpolymorphismus vorliegt. Allerdings stellten wir fest, dass bei Patienten, die homozygote Träger des I-Allels (I/I) des ACE-Polymorphismus sind, ein geringerer nächtlicher Blutdruckabfall vorliegt ($p=0,011$). Außerdem, dass Patienten mit 145A/145A des ADRB1 einen höheren Restgradienten aufweisen und Patienten mit 46G/46G des ADRB2 eine höhere Leistungsfähigkeit. Diese Ergebnisse bedürfen weiterer Untersuchungen.

After correction of an aortic coarctation, many patients develop hypertension even though there is no restenosis present. This work examines the involvement of various genes in blood pressure regulation and their genetic polymorphism. The focus of testing was whether a particular allele frequency was present in those patients with aortic coarctation who developed hypertension over the long-term clinical course. Furthermore, it was questioned if there was a connection between the genetic polymorphism and the severity of the hypertension, circadian blood pressure patterns, blood pressure response under stress and the drug therapy. A total of 283 patients were examined as part of the COALA study in the German Heart Centre Munich (DHM). In addition to taking the patients' medical histories and conducting physical examinations, 24-hour blood pressure monitoring and stress ergometry tests were carried out. The molecular genetics of DNA from 126 patients were examined in the paediatric cardiology laboratory of the Gießen Paediatric Clinic. The genetic polymorphism was determined using PCR, restriction fragment length analysis, automated laser fluorescence fragment length analysis and the 5' nuclease assay (allelic discrimination). Genetic polymorphism was determined for RAAS (ACE, AGT, ATR1, CYP11B2), the endothelin system (EDN1), the endothelial NO synthase (NOS3, exon7/intron4), the β -adrenergic receptors (ADRB1, c.145A>G, ADRB2, c.46A>G, ADRB2, c.79C>G), the G protein (GNB3, GRK4 γ) and fibrillin (FBN1). We were able to show that there was no specific genetic polymorphism in patients who developed hypertension after correction of aortic coarctation. However, we did determine that patients who are homozygous carriers of the I allele (I/I) for the ACE polymorphism have a lower nocturnal fall in blood pressure ($p=0.011$). In addition, we could show that patients with 145A/145A in ADRB1 exhibited higher residual gradients and patients with 46G/46G in ADRB2 had better performance. These results require further investigation.

BAGMET AD, SHESTOPAL NS. I/D-polymorphism of ACE gene, morphofunctional heart condition and blood pressure 24-h profile in young men with arterial hypertension.

Ter.Arkh., 2005; 77:16-20

BARKAI L, SOOS A, VAMOSI I. Association of angiotensin-converting enzyme DD genotype with 24-h blood pressure abnormalities in normoalbuminuric children and adolescents with Type 1 diabetes.

Diabet.Med., 2005; 22:1054-1059

BENEDICT CR, GRAHAME SMITH DG, FISHER A. Changes in plasma catecholamines and dopamine beta-hydroxylase after corrective surgery for coarctation of the aorta.

Circulation, 1978; 57:598-602

BENETOS A, CAMBIEN F, GAUTIER S, RICARD S, SAFAR M, LAURENT S, LACOLLEY P, POIRIER O, TOPOUCHIAN J, ASMAR R. Influence of the angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism on the effects of perindopril and nitrendipine on arterial stiffness in hypertensive individuals.

Hypertension, 1996; 28:1081-1084

BONNARDEAUX A, DAVIES E, JEUNEMAITRE X, FERY I, CHARRU A, CLAUSER E, TIRET L, CAMBIEN F, CORVOL P, SOUBRIER F. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism in human essential hypertension.

Hypertension, 1994; 24:63-69

BRENNER D, LABREUCHE J, POIRIER O, CAMBIEN F, AMARENCO P. Renin-angiotensinogen-aldosterone system in brain infarction and vascular death.

Ann.Neurol., 2005; 58:131-138

BRILI S, DERNELLIS J, AGGELI C. Aortic elastic properties in patients with repaired coarctation of aorta.

Am.J.Cardiol., 1998; 82:1140-1143

CHOY M, ROCCHINI AP, BEEKMAN RH. Paradoxical hypertension after repair of coarctation of aorta in children: balloon angioplasty versus surgical repair.

Circulation, 1987; 75:1186-1191

COCKCROFT JR, GAZIS AG, CROSS DJ, WHEATLEY A, DEWAR J, HALL IP, NOON JP. β_2 -adrenoceptor polymorphism determines vascular reactivity in humans.

Hypertension, 2002; 36:371

COLOMBO MG, ANDREASSI MG, PARADOSSI U, BOTTO N, MANFREDI S, MASETTI S, ROSSI G, CLERICO A, BIAGINI A. Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298Asp polymorphism) to the presence, extent and severity of coronary artery disease.

Heart, 2002; 87:525-528

DUNCAN JA, SCHOLEY JW, MILLER JA. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism in humans: physiology and pathophysiology of the genotypes.

Curr.Opin.Nephrol.Hypertens., 2001; 10:111-116

DAVIES E, HOLLOWAY CD, INGRAM MC, INGLIS GC, FRIEL EC, MORRISON C, ANDERSON NH, FRASER R, CONNELL JMC. Aldosterone excretion rate and blood pressure in essential hypertension are related to polymorphic differences in the aldosterone synthase gene CYP11B2.

Hypertension, 1999; 33:703-707

FALLO F, ARMANINI D, MARAGNO I, MANTERO F. Plasma renin activity in coarctation of the aorta before and after surgical correction.

Br.Heart.J., 1978; 40:1415-1418

FELDER RA, SANADA H, XU J, YU PY, WANG Z, WATANABE H, ASICO LD, WANG W, ZHENG S, YAMAGUCHI I, WILLIAMS SM, GAINER J, BROWN NJ, HAZEN-MARTIN D, WONG LJ, ROBILLARD JE, CAREY RM, EISNER GM, JOSE PA. G protein-coupled receptor kinase 4 gene variants in human essential hypertension.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2002; 99:3872-3877

FOGARTY DG, MAXWELL AP, DOHERTY CC, HUGHES AE, NEVIN NC. ACE gene typing.

Lancet, 1994; 343:851

GREEN SA, TURKI J, BEJARANO P, HALL IP, LIGGETT SB. Influence of β_2 -adrenergic receptor genotypes on signal transduction in human airway smooth muscle cells.

Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol., 1995; 13:25-33

GREEN SA, TURKI J, INNIS M, LIGGETT SB. Amino-terminal polymorphisms of the human β_2 -adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties.

Biochemistry, 1994; 33:9414-9419

HATA A, NAMIKAWA C, SASAKI M, SATO M, NAKAMURA T, TAMURA K, LALOUEL JM. Angiotensinogen as a risk factor for essential hypertension in Japan.

J.Clin.Invest., 1994; 93:1285-1287

HAUSER M, KUEHN A, WILSON N. Abnormal responses for blood pressure in children and adults with surgically corrected aortic coarctation.

Cardiol.Young., 2002; 10:353-357

HECK H, ROST R, HOLLMANN W. Normwerte des Blutdrucks bei der Fahrradergometrie.

Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, 1984; 7:243-249

HOLL RW, PAVLOVIC M, HEINZE E, THON A. Circadian blood pressure during the early course of type 1 diabetes. Analysis of 1,011 ambulatory blood pressure recordings in 354 adolescents and young adults.

Diabetes Care, 1999; 22:1151-1157

HOLODNIY M, KIM S, KATZENSTEIN D, KONRAD M, GROVES E, MERIGAN TC. Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin.

J.Clin.Microbiol., 1991; 29:676-679

IGLARZ M, BENESSIONO J, PHILIP I, VUILLAUMIER-BARROT S, HVASS U, DURAND G, DESMONTS JM, LEVY BI, HENRION D. Preproendothelin-1 gene polymorphism is related to a change in vascular reactivity in the human mammary artery in vitro.

Hypertension, 2002; 39:209-213

INNIS MA, GELFAND DH. PCR protocols: A guide to methods and application.

Academic press, Inc, 1990;3-13

INNIS MA, MYAMBO KB, GELFAND DH, BROW MA. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1988; 85:9436-9440

ISNER JM, DONALDSON RF, FULTON D, BHAN I, PAYNE DD, CLEVELAND RJ. Cystic medial necrosis in coarctation of the aorta: a potential factor contributing to adverse consequences observed after percutaneous balloon angioplasty of coarctation sites.

Circulation, 1987; 75:689-695

JACKSON DP, HAYDEN JD, QUIRKE. Improving the sensitivity and specificity of PCR amplification: Nested PCR.

PCR: A practical approach. Oxford University Press., Oxford, UK, 1991; 42-43

NIWA K, PERLOFF JK, BHUTA SM. Structural abnormalities of great arterial walls in congenital heart disease: light and electron microscopic analyses.

Circulation, 2001; 103:393-400

JEUNEMAITRE X, SOUBRIER F, KOTELEVTSSEV YV, LIFTON RP, WILLIAMS CS, CHARRU A, HUNT SC, HOPKINS PN, WILLIAMS RR, LALOUEL JM. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen.

Cell, 1992; 7:169-180

JULVE R, CHAVES FJ, ROVIRA E. Polymorphism insertion/deletion of the ACE gene and ambulatory blood pressure circadian variability in essential hypertension.

Blood.Press.Monit., 2001; 6:27-32

LEWIS AB, TAKAHASHI M. Plasma catecholamine responses to balloon angioplasty in children with coartation of the aorta.

Am.J.Cardiol., 1988; 62:649-650

LI HH, GYLLENSTEN UB, CUI XF, SAIKI RK, ERLICH HA, ARNHEIM N. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells.

Nature, 1988; 335:414-417

LINDPAINTER K, PFEFFER MA, KREUTZ R, STAMPFER MJ, GRODSTEIN F, LAMOTTE F, BURING J, HENNEKENS CH. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease.

N.Engl.J.Med, 1995; 332:706-711

LYAMICHEV V, BROW MA, DAHLBERG JE. Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases.

Science, 1993; 260:778-783

MATSUBARA M, SUZUKI M, FUJIWARA T. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and hypertension: the Ohasama study.

J.Hypertens., 2002; 20:1121-1126

MEDLEY TL, COLE TJ, GATZKA CD, WANG WY, DART AM, KINGWELL BA. Fibrillin-1 genotype is associated with aortic stiffness and disease severity in patients with coronary artery disease.

Circulation, 2002; 105:810-815

MISONO M, MAEDA S, IEMITSU M. Combination of polymorphism in the beta2-adrenergic receptor and nitric oxide synthase 3 genes increases the risk for hypertension.

J.Hypertens, 2009; 27:1377-1383

MUNROE PB, CAULFIELD MJ. Genetics of hypertension.
Curr.Opin.Genet.Dev., 2000; 10:325-329

OHKUBO T, IMAI Y, TSUJI I. Reference values for 24-hour ambulatory blood pressure monitoring based on a prognostic criterion : the ohasama study.
Hypertension, 1998; 32:255-259

ONG CM, CANTER CE, GUTIERREZ FR, SEKARSKI DR, GOLDRING DR. Increased stiffness and persistent narrowing of the aorta after successful repair of coarctation of the aorta: relationship to left ventricular mass and blood pressure at rest and with exercise.
Am.Heart.J, 1992; 123:1594-1600

PARADOSSI U, CIOFINI E, CLERICO A, BOTTO N, BIAGINI A, COLOMBO MG. Endothelial function and carotid intima-media thickness in young healthy subjects among endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp and T-786C polymorphisms.
Stroke, 2004; 35:1305-1309

PARKER FB jr., FARRELL B, STREETEN DH, BLACKMAN MS, SONDHEIMER HM, ANDERSON GH jr. Hypertensive mechanisms in coarctation of the aorta. Further studies of the renin-angiotensin system.
J.Thorac.Cardiovasc. Surg., 1980; 80:568-573

PONTREMOLI R, RAVERA M, VIAZZI F. Genetic polymorphism of the renin-angiotensin system and organ damage in essential hypertension.
Kidney.Int., 2000; 57:561-569

POWELL JT, TURNER RJ, HENNEY AM, MILLER GJ, HUMPHRIES SE. An association between arterial pulse pressure and variation in the fibrillin-1 gene.
Heart, 1997; 78:396-398

RANADE K, JORGENSEN E, SHEU WH, PEI D, HSIUNG CA, CHIANG FT, CHEN YD, PRATT R, OLSHEN RA, CURB D, COX DR, BOTSTEIN D, RISCH N. A polymorphism in the beta1 adrenergic receptor is associated with resting heart rate.

Am.J.Hum.Genet., 2002; 70:935-942

RIGAT B, HUBERT C, ALHENC-GELAS F, CAMBIEN F, CORVOL P, SOUBRIER F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels.

J.Clin.Invest., 1990; 86:1343-1346

ROCCHINI AP, ROSENTHAL A, BARGER AC, CASTANEDA AR, NADAS AS. Pathogenesis of paradoxical hypertension after coarctation resection.

Circulation, 1976; 54:382-387

ROSMOND R, UKKOLA O, CHAGNON M, BOUCHARD C, BJORNTORP P. Polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor gene (ADRB2) in relation to cardiovascular risk factor in men.

J.Intern.Med., 2002; 248:239-244

ROSS RD, CLAPP SK, GUNTHER S. Augmented norepinephrine and renin output in response to maximal exercise in hypertensive coarctectomy patients.

Am.Heart.J, 1992; 123:1293-1299

ROSSKOPF D, SCHUERKS M, RIMMBACH C, SCHAEFERS R. Genetics of arterial hypertension and hypotension.

Naunyn's Schniedebergs` Arch.Pharmacol., 2007; 374: 429-469

SAY YH, LING KH, DURAISAMY G, ISAAC S, ROSLI R. Angiotensinogen M235T gene variants and its association with essential hypertension and plasma renin activity in Malaysian subjects: a case control study.

BMC Cardiovasc. Disord., 2005; 5:7

SCHUMACHER G. Arterielle Hypertonie bei Aortenisthmusstenose. Pathogenetische Vorstellungen und prognostische Bedeutung. Thieme Verlag, Stuttgart, 1988;

SCHUNKERT H, HENSE HW, DORING A, RIEGGER GA, SIFFERT W. Association between a polymorphism in the G protein beta3 subunit gene and lower renin and elevated diastolic blood pressure levels. Hypertension, 1998; 32:510-513

SEHESTED J, BAANDRUP U, MIKKELSEN E. Different reactivity and structure of the prestenotic and poststenotic aorta in human coarctation. Implications for baroreceptor function. Circulation, 1982; 65:1060-1065

SHANMUGAM V, SELL KW, SAHA BK. Mistyping ACE heterozygotes. PCR Methods Appl., 1993; 3:120-121

SIFFERT W, ROSSKOPF D, ERBEL R, RITZ E. G Protein β 3 subunit 825T allele and hypertension. Curr.Hypertens.Rep., 2003; 5:47-53

SIMSOLO R, GRUNFELD B, GIMENEZ M. Long-term systemic hypertension in children after successful repair of coarctation of the aorta. Am.Heart.J., 1988; 115:1268-1273

SOROF JM, PORTMAN RJ. Ambulatory blood pressure monitoring in the pediatric patient. J.Pediatr., 2000; 136:578-586

SZADOWSKA A, PIETRZAK I, KLICH I, MLYNARSKI W, BODALSKA-LIPINSKA J, BODALSKI J. Polymorphism I/D of the angiotensin-converting enzyme gene and disturbance of blood pressure in type 1 diabetic children and adolescents. Przegl.Lek., 2006; 3:32-36.

TARRKA M, UHARI M, HEIKKILA J, PAKARINEN A. Decreased renal perfusion after correction of experimental coarctation.

Pediatr.Res., 1987; 22:445-448

TIMMERMAN B, MO R, LUFT FC, GERDTS E, BUSJAHN A, OMVIK P, LI GH, SCHUSTER H, WIENKER TF, HOEHE MR, LUND-JOHANSEN P. Beta-2 adrenoceptor genetic variation is associated with genetic predisposition to essential hypertension: The Bergen Blood Pressure Study.

Kidney Int., 1998; 53:1455-1460

TIRET L, POIRIER O, HALLET V, MCDONAGH TA, MORRISON C, MCMURRAY JJV, DARGIE HJ, ARVEILER D, RUIDAVETS JB, LUC G, EVANS A, CAMBIEN F. The Lys198Asn polymorphism in the endothelin-1 gene is associated with blood pressure in overweight people.

Hypertension, 1999; 33:1169-1174

TSUKADA T, YOKOYAMA K, ARAI T, TAKEMOTO F, HARA S, YAMADA A, KAWAGUCHI Y, HOSOYA T, IGARI J. Evidence of association of the ecNos gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans.

Biochem.Biophys.Res.Comm., 1998; 245:190-193

UWABO J, SOMA M, NAKAYAMA T, KANMATSUSE K. Association of a variable number of tandem repeats in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese.

Am.J.Hypertens., 1998; 11:125-128

VERDECCHIA P, PORCELLATI C, SCHILLACI G. Ambulatory blood pressure. An independent predictor of prognosis in essential hypertension.

Hypertension, 1994; 24:793-801

XU J, SHIOTA T, OMOTO R. Intravascular ultrasound assessment of regional aortic wall stiffness, distensibility and compliance in patients with coarctation of the aorta.

Am.Heart.J., 1997; 134:93-98

YANAGISAWA M, KURIHARA H, KIMURA S, GOTO K, MASAKI T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels.

J.Hypertens.Suppl., 1988; 6:188-191

YILMAZ A, KAYA MG, MERDANOGLU U, ERGUN MA, CENGEL A, MENEVSE S. Association of beta-1 and beta-2 adrenergic receptor gene polymorphisms with myocardial infarction.

J.Clin.Lab.Anal., 2009; 23:237-243

YOKOTA M, TATSUMI N, NATHALANG O, YAMADA T, TSUDA I. Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells.

J.Clin.Lab.Anal., 1999; 13:133-140

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

Mein Dank geht in erster Linie an meine Familie. An meine Mutter, die mich mit ihrem Vertrauen in meine Fähigkeiten nie hat zweifeln lassen, dass ich alles erreichen kann, was ich möchte. An meine große Schwester Simone, die mit Abstand der beste Mensch ist, den ich kenne, die immer ein liebes Wort zur richtigen Zeit hat. An meine jüngere Schwester Sara, die mit Abstand der ehrlichste Mensch ist und es immer wieder schafft, mein Weltbild gerade zu rücken. An meine Stiefmutter Sabine mit meinen Schwestern Laura und Dana, die mir gezeigt haben, dass es im größten Schmerz ein Morgen gibt und man immer wieder eine Möglichkeit hat, glücklich zu werden, wenn man nur daran glaubt. An meinen Vater, der viel zu früh und ohne Vorwarnung von mir gegangen ist und damit eine Lücke hinterlassen hat, die jeden Tag schmerzt und niemals zu füllen sein wird. Der mir mit seinem Ehrgeiz, seiner Intelligenz und auch seinen Zweifeln immer wieder Ansporn gegeben hat, das zu tun, was ich für richtig halte und zu mir selbst zu stehen. An meine liebe Oma, die mir vor allem den Traum von der Medizin „vererbt“ hat und von der ich viel gelernt habe. Danke auch an Bernd, der zu einem wichtigen Begleiter für mich und einem wunderbaren Familienmitglied für uns alle geworden ist.

Danke an meine besten Freundinnen Steffi, Noa, Valentina und Inga, die in meiner größten Krise an meiner Seite gestanden haben und keinen Zentimeter von mir gewichen sind, die ich nie im Leben aufgeben möchte, egal, wie weit sie von mir entfernt sind. Die mir gezeigt haben, was wirkliche Stärke ist und denen ich irgendwann einmal das zurückgeben möchte, was sie mir gegeben haben, mit dem Wissen, dass das eigentlich gar nicht möglich ist.

Danke auch an Kirstin Salser, die man nicht einfach nur „MTA des Kinderkardiologischen Labor“ nennen darf. Das würde ihr nicht im Geringsten gerecht werden. Sie ist und war wissenschaftliche Stütze, persönlicher Ratgeber und Seelentröster in allen Lebenslagen. Ohne sie wären diese

Doktorarbeit und so vieles mehr nicht zustande gekommen. Sie ist ein wichtiger Mensch in meinem Leben geworden.

Vielen Dank an Prof. Alfred Hager aus dem Deutschen Herzzentrum München, dessen Herzblut in dieser Arbeit liegt. Ich hätte mir keinen besseren Begleiter vorstellen können. Sein wissenschaftliches Interesse, seine unermüdliche Hilfestellung, vor allem aber sein Witz und seine Menschlichkeit haben mich immer sehr beeindruckt und mir zu einem guten Freund gemacht.

Danke an Prof. Jochen Kreuder, der mir das Thema dieser Doktorarbeit ans Herz gelegt hat und an Prof. H.-R. Tinneberg, der mich sehr bei der Ausarbeitung der Arbeit unterstützt und gefördert hat.

Mein größter Dank geht an meine Tochter Leni Sophia. Sie hat mein ganzes Leben verändert und von niemandem habe ich so viel gelernt wie von ihr. Sie ist mein Wunder und jeder Tag mit ihr ist ein Geschenk. Ihr widme ich diese Arbeit- und auch alles zukünftige Tun.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die ich wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

12 ANHANG

Zu 3.3.1: Geräte und Arbeitsmaterialien

ABIPrism® 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, UK
ABIPrism® 7700 Sequence Detector	Applied Biosystems, UK
DistriMan (Pipettierhilfe)	Abimed, Langenfeld
Distri Tip Maxi (12,5 ml)	Gilson, USA
Elektrophoresekammern	Keutz, Reiskirchen
Elektrophoresekammern	Keutz, Reiskirchen
Glasmaterialien (Messbecher, Glasbecher)	Schott, Mainz
Heizblock	Techne, UK
Mikrowelle	Severin, Sundern
Nescofilm	Roth, Karlsruhe
PCR-Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400)	Perkin-Elmer, Überlingen
PCR-Gefäße (0,2 ml)	Greiner, Frickenhausen
Pipetten (verstellbar)	Abimed, Langenfeld

Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Sofortbildkamera Polaroid MP-4	Polaroid, USA
Spannungsquelle	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Spektralphotometer	Pharmacia Biotech, USA
Tischrührer („Vortexer“)	Janke und Kunkel, Staufen
UV-Stratalinker	Stratagene, Kanada
Waage	Scaltec, Heiligenstedt
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen

Zu 3.3.2: Oligonukleotide

NAME	SEQUENZ	bp	RICHTUNG	FIRMA
ACE-up	5'GCCCTGCAGGTGTCTGCA GCATGT3'	24	Forward	Roth
ACE-do	5'CCATGGCTCTCCCCGCCT TGTCTC3'	24	Reverse	Roth
ACE-ins-up	5'TGGGACCACAGCGCCCGC CACTAC5'	24	Forward	Roth
ACE-ins-do	5'TCGCAAGCCCTCCCATGC CCATAA3'	24	Reverse	Roth
CYP11B2-up	5'CAGGAGGAGACCCCATG TGAC3'	21	Forward	Roth
CYP11B2-do	5'CCTCCACCCTGTTCAGCC C3'	19	Reverse	Roth
CYP11B2-int-	5'CGTATCGAGATTCTCAC	25	Forward	Roth

up	ATGGAAC3'			
CYP11B2-int-do	5'CTGCTCTGGAAACATATC ACGTC3'	23	Reverse	Roth
ATR1-up	5'AATGCTTGTAGCCAAAGT CACCT3'	23	Forward	Roth
ATR1-do	5'GGCTTTGCTTTGTCTTGTT G3'	20	Reverse	Roth
ATR1-int-up	5'GAGAACACCAATATTACA GTTTGTG3'	25	Forward	Roth
ATR1-int-do	5'AAGTCGGTTCAGTCCACA TAATG3'	23	Reverse	Roth
AGT-1	5'TGGTCCTCCCACGCTCTC TGGACTTCAC3'	28	Forward	Roth
AGT-2	5'CCAGGGTGCTGTCCACAC TGGCTCCGG3'	27	Reverse	MWG
AGT-3	5'AAGTGGACGTAGGTGTTG AAAGGG AGGGTGCTGTCCACACTGG CTTCCA3'	49	Reverse	MWG
EDN1-up	5'AGTAGCAGAGAGATCTAT GCATCC3'	24	Forward	Roth
EDN1-do	5'CAGCATGTTCTAAATTCT ACCAACCC3'	26	Reverse	Roth
EDN1-int-up	5'AATCCCTCTTAAATATTT CGAT GAAGCTCTG3'	31	Forward	Roth
EDN1-int-do	5'CAGCATGTTCTAAATTCT ACCAACCC3'	26	Reverse	Roth
NOS3-Ex7-up	5'AAGGCAGGAGACAGTGG ATGGAGG3'	24	Forward	MWG
NOS3-Ex7-do	5'CACCCAGTCAATCCCTTT GGTGCTCACG3'	28	Reverse	MWG
NOS-Ex7-int-up	5'CTGAGGAGGGCATGAGG CTGAGC CCCAGAAC3'	31	Forward	MWG
NOS-Ex7-int-do	5'CCAGTCAATCCCTTTGGA GCTCAC3'	24	Reverse	MWG
NOS3-In4-up	5'AGTAGTGAAGACCTGGTT ATCAGG3'	24	Forward	MWG
NOS3-In4-do	5'GCTTGCTTCTCTTAGTGCT	22	Reverse	MWG

	GTG3'			
GNB3-up	5'TGACCCACTTGCCACCCG TGC3'	21	Forward	Roth
GNB3-do	5'GAAGCAGCAGCCAGGGC TGGC3'	21	Reverse	Roth
GNB3-int-up	5'AATGGAGAGGCCATCTGC ACGGGCTC3'	26	Forward	Roth
GNB3-int-do	5'CACACGCTCAGACTCCAT GGAGTC3'	24	Reverse	Roth
ADRB1-145- up	5'CGCCTCGTTGCTGCCTCC CGCCAGCGAAAGCCCCGAG CCGCTGTCTCAGCAGTGGA CAGC3'	60	Forward	MWG
ADRB1-145- do	5'CGCCTCGTTGCTGCCTCC CGCCAGCGAAGCCCCGAG CCGCTGTCTCAGCAGTGGA CAGC3'	60	Reverse	MWG
ADRB1-145- FAM-Sonde	5'-FAM- CAGCGAAAGCCCCGAG- MBG-3'	16	Allel A	ABI
ADRB1-145- VIC-Sonde	5'-VIV- CAGCGAAGGCCCCGA- MBG-3'	15	Allel G	ABI
ADRB2-46-up	5'AACGGCAGCGCCTTCTT3'	17	Forward	MWG
ADRB2-46-do	5'ATGAGAGACATGACGAT GCCC3'	21	Reverse	MWG
ADRB2-46- FAM-Sonde	5'-FAM- ACCCAATAGAAGCCA- MBG-3'	15	Allel A	ABI
ADRB2-46- VIC-Sonde	5'-VIC-ACCCAATGGAAGCC- MBG-3'	14	Allel G	ABI
ADRB2-79-up	5'AAGCCATGCGCCGGA3'	15	Forward	MWG
ADRB2-79-do	5'ATGAGAGACATGACGAT GCCC3'	21	Reverse	MWG
ADRB2-79- FAM-Sonde	5'-FAM-TCACGCAGCAAAG- MGB-3'	13	C- Allel	MWG
ADRB2-79- VIC-Sonde	5'-VIC-ACCCAATGGAAGCC- MGB-3'	14	G- Allel	MWG
FBN1-up	5'GCCTGCAACCCTGGCTAC CATTCAAC3'	26	Forward	MWG

FBN1-do	5'FAM- ATCTCAGAGTACATAGAGT GTTTTAG3'	26	Reverse	MWG
GRK4 γ -up	5'GGGACTGAAGGAGGAGA ACCC3'	21	Forward	MWG
GRK4 γ -do	5'GCTCAGCATGAACCACTT ACCTAG3'	24	Reverse	MWG
GRK4 γ -up- Sonde	5'-FAM- CAAAAAAGCCTTTGAGGAA T-MGB-3'	20	C- Allel	ABI
GRK4 γ -do- Sonde	5'-VIC- CCAAAAAAGTCTTTGAGGA AT-MGB-3'	21	T- Allel	ABI

Zu 3.3.3: Chemikalien

Agarose, universal	Peqlab, Erlangen
Agarose, wide range (3:1)	Sigma, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BsaI I-Enzym	New England, USA
Dde I-Enzym	New England, USA
DNA-Längenmarker XIII	Roche, Mannheim
dNTPs	Roth, Karlsruhe
EDTA	Sigma, München
Eisessig	Riedel des Haen, Seelze
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze

Ethidiumbromid	Qbiogen, Frankreich
Formamid	Applied Biosystems, UK
Gene Scan-400HD Size Standard	Applied Biosystems, UK
Glycerin	Sigma, München
Hae III-Enzym	New England, USA
LiChrosolv-Wasser	Merck, Darmstadt
Milli-Q PF Plus Anlage	Millipore, Frankreich
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Nde II-Enzym	Roche, Mannheim
PCR-Puffer (10x)	Applied Biosystem, UK
Polymer 3100 POP- 6	Applied Biosystems, UK
QIAmp [®] DNA Mini Kit (250)	Qiagen, Düsseldorf
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen, Düsseldorf
Sequence Puffer (10x) mit EDTA	Applied Biosystems, UK
SDS	Sigma, München
Taq I-Enzym	New England, USA
TaqMan Universal PCR Mastermix	Applied Biosystems, UK

Zu 3.3.4: Lösungen

Blaumarker:

Bromphenolblau	62,5 mg
Glycerin	28,7 ml
SDS	250,0 mg
Na ₂ EDTA pH 8,0 (0,5 M)	5,0 ml
Destilliertes Wasser	16,3 ml

TAE- Puffer (50x), Ansatz für 1,0 Liter:

Tris- Puffer	242,0 g
Eisessig	78,0 ml
EDTA pH 8,0 (0,5 M)	100,0 ml

Zu 3.3.5: Besondere Software

Access für Windows 2000	Microsoft Software Inc., USA
GeneScan Analysis 3.7.	Applied Biosystems, UK
Sequence Detector 1.6.3.	Applied Biosystems, UK
SPSS for Windows 12.0	SPSS Inc., USA

Zu 3.4.2.1: Reagentienmix und Temperaturprotokoll des ACE

5,0 µl	10xPCR-Puffer
4,0 µl	dNTPs (10 mM)
1,0 µl	ACE-up-Primer (20 µM)
1,0 µl	ACE-do-Primer (20 µM)
0,5 µl	Ampli-Taq-Gold (=2,5 U)
1,0 µl	genomische DNA (50 ng)
37,5 µl	destilliertes Wasser

50,0 µl

10 min	94°C	(Startphase)
15 sec	94°C	
30 sec	65°C	
90 sec	72°C+3 sec/ Zyklus	
5 min	72°C	(Endphase)

35 Zyklen

Nachfolgend Kühlung auf 4°C

Zu 3.4.2.1.1: Reagentienmix und Temperaturprotokoll der Insertionsvariante des ACE

5,0 µl	10xPCR-Puffer
4,0 µl	dNTPs (10 mM)
1,0 µl	ACE-ins-up-Primer (20 µM)
1,0 µl	ACE-ins-do-Primer (20 µM)
0,5 µl	Ampli-Taq-Gold (=2,5 U)
1,0 µl	genomische DNA (50 ng)
37,5 µl	destilliertes Wasser

50,0 µl

10 min	94°C	(Startphase)
15 sec	94°C	
30 sec	67°C	
60 sec	72°C+3 sec/ Zyklus	

35 Zyklen

Nachfolgend Kühlung auf 4°C.

Zu 3.4.2.1.2: Reagentienmix und Temperaturprotokoll des AGT

5,0 µl	10xPCR-Puffer
4,0 µl	dNTPs (10 mM)
1,0 µl	AGT-int-up-Primer (20 µM)
1,0 µl	AGT-2-Primer (10 µM)
1,0 µl	AGT-3-Primer (20 µM)
0,5 µl	Ampli-Taq-Gold (=2,5 U)
1,0 µl	genomische DNA (50 ng)
36,5 µl	destilliertes Wasser

50,0 µl

Temperaturprotokoll:

10 min	94°C	(Startphase)
45 sec	94°C	
50 sec	62°C	
60 sec	72°C+3 sec/ Zyklus	
5 min	72°C	(Endphase)

42 Zyklen

Nachfolgend Kühlung auf 4°C.

Zu 3.4.2.1.3: Reagentienmix und Temperaturprotokoll der endothelialen NO-Synthase im Intron 4 (NOS3)

5,0 µl	10xPCR-Puffer
4,0 µl	dNTPs (10 mM)
1,0 µl	NOS3-In4-up-Primern (20 µM)
1,0 µl	NOS3-In4-do-Primern (20 µM)
0,5 µl	Ampli-Taq-Gold (=2,5 U)
1,0 µl	genomische DNA (50 ng)
37,5 µl	destilliertes Wasser

50,0 µl

10 min	94°C	(Startphase)
45 sec	94°C	
45 sec	60°C	
90 sec	72°C+3 sec/ Zyklus	
5 min	72°C	(Endphase)

35 Zyklen

Danach wurde das Produkt vom Thermocycler auf 4°C herunter gekühlt.

Zu 3.4.3.2: Reagentienmix und Temperaturprotokoll des Angiotensin II-Rezeptor Typ-1 (AGTR1)

Reagentienmix I:

5,0 µl	10xPCR-Puffer
4,0 µl	dNTPs (10 mM)
0,2 µl	AGTR1-up-Primer (20 µM)
0,2 µl	AGTR1-do-Primer (20 µM)
0,5 µl	Ampli-Taq-Gold (=2,5 U)
1,0 µl	genomische DNA (50 ng)
39,1 µl	destilliertes Wasser

50,0 µl

Temperaturprotokoll I:

10 min	94°C	(Startphase)
45 sec	94°C	
60 sec	55°C	
120 sec	72°C+3 sec/ Zyklus	

35 Zyklen

Nachfolgend Kühlung auf 4°C.

Reagentienmix II:

5,0 µl	10 xPCR-Puffer
4,0 µl	dNTPs (10 mM)
1,0 µl	AGTR1-int-up-Primer (20 µM)
1,0 µl	AGTR1-int-do-Primer (20 µM)
0,5 µl	Ampli-Taq-Gold (=2,5 U)
2,0 µl	1.PCR-Produkt
36,5 µl	destilliertes Wasser

50,0 µl

Temperaturprotokoll II:

10 min	94°C	(Startphase)
45 sec	94°C	
60 sec	63°C	
90 sec	72°C+3 sec/ Zyklus	

30 Zyklen

Nachfolgend Kühlung auf 4°C.

Restriktionsverdau:

14,0 µl	gereinigtes PCR-Produkt
2,0 µl	Dde I-Puffer
0,6 µl	Dde I (=6 U)
3,4 µl	destilliertes Wasser

20,0 µl

Zu 3.4.3.3: Reagentienmix und Temperaturprotokoll der Aldosteronsynthetase (CYP11B2)

Reagentienmix I:

5,0 µl	10xPCR-Puffer
4,0 µl	dNTPs (10 mM)
0,4 µl	CYP11B2-up-Primer (20 µM)
0,4 µl	CYP11B2-do-Primer (20 µM)
0,5 µl	Ampli-Taq-Gold (=2,5 U)
1,0 µl	genomische DNA (50 ng)
38,7 µl	destilliertes Wasser

50,0 µl

Temperaturprotokoll I:

10 min	94°C	(Startphase)
45 sec	94°C	
50 sec	58°C	
90 sec	72°C+3 sec/ Zyklus	

35 Zyklen

Nachfolgend Kühlung auf 4°C.

Reagentienmix II:

5,0 µl	10xPCR-Puffer
4,0 µl	dNTPs (10 mM)
1,0 µl	CYP11B2-int-up-Primer (20 µM)
1,0 µl	CYP11B2-int-do-Primer (20 µM)
0,5 µl	Ampli-Taq-Gold (=2,5 U)
1,0 µl	1.PCR-Produkt
37,5 µl	destilliertes Wasser

50,0 µl

Temperaturprotokoll II:

10 min	94°C	(Startphase)
45 sec	94°C	
50 sec	60°C	
90 sec	72°C+3 sec/ Zyklus	

25 Zyklen

Nachfolgend Kühlung auf 4°C.

Restriktionsverdau:

14,0 µl	gereinigtes PCR-Produkt
2,0 µl	Hae III-Puffer
0,4 µl	Hae III (=4 U)
3,6 µl	destilliertes Wasser

20,0 µl

Zu 3.4.3.4: Reagentienmix und Temperaturprotokoll des Endothelin (EDN1)

Reagentienmix I:

5,0 µl	10xPCR-Puffer
4,0 µl	dNTPs (10 mM)
0,4 µl	EDN1-up-Primer (20 µM)
0,4 µl	EDN1-do-Primer (20 µM)
0,5 µl	Ampli-Taq-Gold (=2,5 U)
1,0 µl	genomische DNA (50 ng)
38,7 µl	destilliertes Wasser

50,0 µl

Temperaturprotokoll I:

10 min	94°C	(Startphase)
45 sec	94°C	
50 sec	55°C	
75 sec	72°C+3 sec/ Zyklus	

35 Zyklen

Nachfolgend Kühlung auf 4°C.

Reagentienmix II:

5,0 µl	10xPCR-Puffer
4,0 µl	dNTPs (10 mM)
1,0 µl	EDN1-int-up-Primer (20 µM)
1,0 µl	EDN1-int-do-Primer (20 µM)
0,5 µl	Ampli-Taq-Gold (=2,5 U)
1,0 µl	1.PCR-Produkt
37,5 µl	destilliertes Wasser

50,0 µl

Temperaturprotokoll II:

10 min	94°C	(Startphase)
45 sec	94°C	
50 sec	55°C	
60 sec	72°C+3 sec/ Zyklus	

25 Zyklen

Nachfolgend Kühlung auf 4°C.

Enzymverdauansatz:

11,0 µl	gereinigtes PCR-Produkt
2,0 µl	Taq I-Puffer
0,5 µl	Taq I (=10 U)
6,5 µl	destilliertes Wasser

20,0 µl

Zu 3.4.3.5: Reagentienmix und Temperaturverlauf der endothelialen NO-Synthase im Exon 7 (NOS3)

Reagentienmix I:

5,0 µl	10xPCR-Puffer
4,0 µl	dNTPs (10 mM)
0,2 µl	NOS3-Ex7-up-Primer (20 µM)
0,2 µl	NOS3-Ex7-do-Primer (20 µM)
0,5 µl	Ampli-Taq-Gold (=2,5 U)
1,0 µl	genomische DNA (50 ng)
39,1 µl	destilliertes Wasser

50,0 µl

Temperaturverlaufsprotokoll I:

10 min	94°C	(Startphase)
45 sec	94°C	
50 sec	65°C	
90 sec	72°C+3 sec/ Zyklus	

30 Zyklen

Nach Beendigung der PCR kühlte der Thermocycler das Produkt auf 4°C herunter.

Reagentienmix II:

5,0 µl	10xPCR-Puffer
4,0 µl	dNTPs (10 mM)
1,0 µl	NOS3-Ex7-int-up-Primer (20 µM)
1,0 µl	NOS3-Ex7-int-do-Primer (20 µM)
0,5 µl	Ampli-Taq-Gold (=2,5 U)
1,0 µl	1.PCR-Produkt
37,5 µl	destilliertes Wasser

50,0 µl

Temperaturverlaufsprotokoll II:

10 min	94°C	(Startphase)
45 sec	94°C	
50 sec	63°C	
60 sec	72°C+3 sec/ Zyklus	

25 Zyklen

Auch danach wurde das PCR- Produkt auf 4°C herunter gekühlt.

Restriktionsverdau:

8,0 µl	gereinigtes PCR-Produkt
2,0 µl	Nde II-Puffer
1,2 µl	Nde II (=6 U)
8,8 µl	destilliertes Wasser

20,0 µl

Zu 3.4.3.6: Reagentienmix und Temperaturverlauf des G-Protein/ β 3-Untereinheit (GBN3)

Reagentienmix I:

5,0 μ l	10xPCR-Puffer
4,0 μ l	dNTPs (10 mM)
0,2 μ l	GNB3-up-Primer (20 μ M)
0,2 μ l	GNB3-do-Primer (20 μ M)
0,5 μ l	Ampli-Taq-Gold (=2,5 U)
1,0 μ l	genomische DNA (50 ng)
39,1 μ l	destilliertes Wasser

50,0 μ l

Temperaturverlaufsprotokoll I:

10 min	94°C	(Startphase)
45 sec	94°C	
50 sec	63°C	
75 sec	72°C+3 sec/ Zyklus	

35 Zyklen

Der Thermocycler kühlte nach dem PCR-Lauf das Produkt auf 4°C herab.

Reagentienansatz II:

5,0 μ l	10xPCR-Puffer
4,0 μ l	dNTPs (10 mM)
1,0 μ l	GNB3-int-up-Primer (20 μ M)
1,0 μ l	GNB3-int-do-Primer (20 μ M)
0,5 μ l	Ampli-Taq-Gold (=2,5 U)
2,0 μ l	1.PCR-Produkt
36,5 μ l	destilliertes Wasser

50,0 μ l

Temperaturverlaufsprotokoll II:

10 min	94°C	(Startphase)
45 sec	94°C	
50 sec	62°C	
60 min	72°C+3 sec/ Zyklus	

25 Zyklen

Auch nach diesem Lauf wurde das PCR- Produkt auf 4°C herunter gekühlt.

Restriktionsverdau:

10,0 µl	gereinigtes PCR-Produkt
2,0 µl	BsaI I-Puffer
3,2 µl	BsaI I (=8 U)
4,8 µl	destilliertes Wasser

20,0 µl

Zu 3.4.4.1: Reagentienmix und Temperaturprotokoll des Fibrillin-1 (FBN1)

5,0 µl	10xPCR-Puffer
4,0 µl	dNTPs (200 µM)
0,5 µl	FBN1-up-FAM-Primer
0,5 µl	FBN1-do-Primer
0,5 µl	Ampli-Taq-Gold (=2,5 U)
1,0 µl	genomische DNA (5 ng)
38,5 µl	destilliertes Wasser

50,0 µl

10 min	94°C	(Startphase)
30 sec	94°C	
45 sec	60°C	
60 sec	72°C+3 sec/ Zyklus	

30 Zyklen

Das Produkt wurde nach den 30 Zyklen vom Thermocycler auf 4°C herunter gekühlt.

Analysemix:

12,0 µl	Formamid
0,35 µl	Längenstandard
1,0 µl	PCR-Produkt

13,35 µl

Zu 3.4.5.1: Reagentienmix und Temperaturprotokoll der adrenergen β_1 -Rezeptoren (ARDB1,c.145A>G)

7,5 µl	2xTaqMan Universal PCR Mastermix
0,3 µl	Sonde-145-FAM (5 µM)
0,6 µl	Sonde-145-VIC (5 µM)
0,45 µl	ARDB1-145-up-Primer (10 µM)
1,35 µl	ARDB1-145-do-Primer (10 µM)
1,0 µl	genomische DNA (50 ng)
3,8 µl	destilliertes Wasser

15,0 µl

2 min	50°C	(Startphase)
10 min	95°C	(Startphase)
15 sec	92°C	
60 sec	60°C	

35 Zyklen

Nach Beendigung der Reaktion wurde das Produkt auf 4°C herunter gekühlt.

Zu 3.4.5.2.1: Reagentienmix und Temperaturprotokoll des ARDB2,c.46A>G

7,5 µl	2xTaqMan Universal PCR Mastermix
0,6 µl	Sonde-46-FAM (5 µM)
0,6 µl	Sonde-46-VIC (5 µM)
1,35 µl	ARDB2-46-up-Primer (10 µM)
1,35 µl	ARDB2-46-46-do-Primer (10 µM)
1,0 µl	genomische DNA (50 ng)
2,6 µl	destilliertes Wasser

15,0 µl

Die Belegung der Platte erfolgte nach dem bekannten Belegungsplan.

2 min	50°C	(Startphase)
10 min	95°C	(Startphase)
15 sec	92°C	
60 sec	60°C	

35 Zyklen

Nach Beendigung der Reaktion wurde das Produkt auf 4°C herunter gekühlt.

Zu 3.4.5.2.2: Reagentienmix und Temperaturprotokoll des ARDB2,c.79C>G

7,5 µl	2xTaqMan Universal PCR Mastermix
0,5 µl	Sonde-79-FAM (5 µM)
0,5 µl	Sonde-79-VIC (5 µM)
1,35 µl	ARDB2-79-up-Primer (10 µM)
1,35 µl	ARDB2-79-do-Primer (10 µM)
1,0 µl	genomische DNA (50 ng)
2,6 µl	destilliertes Wasser

15,0 µl

Die Belegung der Platte erfolgte nach dem bekannten Belegungsplan.

2 min	50°C	(Startphase)
10 min	95°C	(Startphase)
15 sec	92°C	
60 sec	60°C	

35 Zyklen

Zu 3.4.5.3: Reagentienmix und Temperaturprotokoll der G-Protein-Rezeptor-Kinase-4 γ (GRK4 γ)

7,5 μ l	2xTaqMan Universal PCR Mastermix
0,3 μ l	Sonde-FAM (5 μ l)
0,45 μ l	Sonde-VIC (5 μ l)
1,35 μ l	GRK4 γ -up-Primer (10 μ M)
1,35 μ l	GRK4 γ -do-Primer (10 μ M)
1,0 μ l	genomische DNA
3,05 μ l	destilliertes Wasser

15,0 μ l

2 min	50°C	(Startphase)
10 min	95°C	(Startphase)
15 sec	92°C	
60 sec	60°C	

35 Zyklen

Nach Beendigung der 35 Zyklen wurde das Produkt von dem Gerät auf 4°C herunter gekühlt.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5622-3

